HARVARD UNIVERSITY
SCHOOLS OF MEDICINE AND PUBLIC HEALTH
LIBRARY APR 13 1954

NAUNYN-SCHMIEDEBERGS

ARCHIV

FÜR

EXPERIMENTELLE PATHOLOGIE UND PHARMAKOLOGIE

UNTER MITWIRKUNG
DER DEUTSCHEN PHARMAKOLOGISCHEN GESELLSCHAFT

HERAUSGEGEBEN VON

DR. L. HEILMEYER
PROFESSOR DER INNEREN MEDIZIN
FREIBURG i. Br.

DR. W. HEUBNER
EM. PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
HEIDELBERG

DR. L. LENDLE
PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
GÖTTINGEN

224. BAND, 5./6. (SCHLUSS-) HEFT
MIT 45 TEXTABBILDUNGEN
ABGESCHLOSSEN AM 15. FEBRUAR 1955

BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
SPRINGER-VERLAG
1955

rch. exper. Path. u. Pharmakol.

Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie
Begründet 1873 von *B. Naunyn, O. Schmiedeberg, E. Klebs.* Unter Mitwirkung von Fachgenossen herausgegeben von *L. Krehl, W. Straub, W. Heubner* u. a., ab Band 208/2 unter Mitwirkung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft.
Band 2—158 (1931) Leipzig, F. C. W. Vogel, Band 159—198 (1941) Berlin, F. C. W. Vogel.
Ab Band 199 Berlin, Springer.

Die Zeitschrift erscheint nach Maßgabe des eingehenden Materials in Heften, die zu Bänden zusammengestellt werden. Der Preis des Bandes beträgt DM 82.—.
Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.
Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme, Mikrophote u. ä. von den Zeitschriften, von einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.
Bei Arbeiten aus Instituten ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.
Die Mitarbeiter erhalten von ihren Arbeiten 75 Sonderdrucke unentgeltlich.
Manuskripte sind zu senden an:
Prof. Dr. W. HEUBNER, Heidelberg, Ladenburger Str. 69,
Prof. Dr. L. LENDLE, Göttingen, Geiststr. 9, Pharmakologisches Institut der Universität,
Prof. Dr. L. HEILMEYER, Freiburg i. Br., Hugstetterstr. 55, Medizinische Universitätsklinik,
oder an den

Springer-Verlag

Heidelberg Neuenheimer Landstr. 24, Fernsprecher 2440 — **Berlin W 35** Reichpietschufer 20, Fernsprecher 24 92

224. Band **Inhaltsverzeichnis.** 5./6. (Schluß-) Heft

Seite

Fleckenstein, A., und **D. Stöckle,** Zum Mechanismus der Wirkungs-Verstärkung und Wirkungs-Abschwächung sympathomimetischer Amine durch Cocain und andere Pharmaka. II. Mitteilung. Die Hemmung der Neuro-Sympathomimetica durch Cocain. Mit 9 Textabbildungen 401

Wagenmann, U., E. Schmid und **R. Taugner,** Vergleichende Untersuchungen über die Kreislauf- und Atmungswirkung der Adenosinkörper am wachen Hund. Mit 3 Textabbildungen 416

Schmid, E., M. v. Bubnoff, U. Wagenmann und **R. Taugner,** Zur Kreislaufwirkung der Magnesiumsalze. Mit 4 Textabbildungen 426

Langnickel, D., D. Lüders, E. Schmid und **R. Taugner,** Zur Wechselwirkung von Kohlensäure und Krampfgiften. Mit 5 Textabbildungen 434

v. Bubnoff, M., D. Hoffmann, E. Schmid und **R. Taugner,** Zur sympatholytischen, adrenolytischen und noradrenolytischen Wirkung der Phenothiazine. Mit 3 Textabbildungen 443

Schmid, E., H. Ganz, W. Braun und **R. Taugner,** Zur Nierenausscheidung von P^{32} als Orthophosphat und Glycerophosphat 452

Fleckenstein, A., J. Janke, R. Kruse und **G. Lechner,** Über das Verhalten von Adenosintriphosphat, Adenosindiphosphat und anderen Phosphorsäure-Estern bei der Kontraktur des Froschrectus durch Acetylcholin, Nicotin und Succinylbischolin. Mit 1 Textabbildung 465

Oster, H., H.-W. Kundt und **R. Taugner,** Methodische Untersuchungen zur autoradiographischen Darstellung wasserlöslicher Stoffe in der Niere. Mit 4 Textabbildungen 476

Fleckenstein, A., J. Eigler und **H. Bruch,** Adsorptionsversuche an der Kolloidiummembran zur Differenzierung endplattenblockierender Pharmaka mit depolarisierender bzw. depolarisationshemmender Grundwirkung. Mit 4 Textabbildungen 483

Gerlach, E., und **E. Weber,** Papierchromatographische Trennungsmethode für die säurelöslichen Phosphorverbindungen aus Nierengewebe. Mit 10 Textabbildungen 496

Waltz, H., M. Bartels und **H. Matthies,** Zur Wirkung von ACTH, DOCA, Testosteronpropionat und Thyroxin auf die Pentothal-Schlafzeit hypophysektomierter Ratten. (Kurze Mitteilung) 523

Straub, H.-G., E. Feucht, A. Schäfer und **R. Taugner,** Lungenvolumen und Überlebenszeit des Atmungszentrums bei Erstickung unter Berücksichtigung von Glucose und Glutaminsäure. Mit 2 Textabbildungen 528

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinn der Warenzeichen- und Warenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 224, S. 401—415 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. F. Eichholtz).

Zum Mechanismus der Wirkungs-Verstärkung und Wirkungs-Abschwächung sympathomimetischer Amine durch Cocain und andere Pharmaka*.

II. Mitteilung.

Die Hemmung der Neuro-Sympathomimetica durch Cocain**.

Von
A. Fleckenstein und D. Stöckle.

Mit 9 Textabbildungen.

(Eingegangen am 12. Oktober 1954.)

Die Pharmakologie kennt schon lange 2 Zustände hochgradiger Sensibilisierung für Sympathomimetica

a) den Zustand nach Degeneration der postganglionären sympathischen Nerverfasern,

b) den Zustand nach Verabreichung von Cocain.

Die Sympathomimetica der Brenzkatechin-Reihe (Adrenalin, Noradrenalin, Dioxyphenyläthylamin, Epinin, Corbasil, Dioxyephedrin, Dioxyphenylmorpholin) wirken z. B. an der chronisch denervierten bzw. cocainisierten Nickhaut der Katze um ein Vielfaches verstärkt. Am kräftigsten ist dabei die Potenzierung von Noradrenalin, Epinin und Corbasil, die unter diesen Bedingungen 30—60mal höhere Nickhaut-Kontraktionen erzeugen können als normal.

In vorausgegangenen Untersuchungen (Fleckenstein u. Bass, 1953) wurde die Potenzierung dieser Stoffe durch Cocain mit der Potenzierung durch Denervierung verglichen. Dabei ergab sich, daß die akut cocainisierten und die chronisch denervierten Nickhäute in einem weiten Dosierungsbereich der verschiedenen Sympathomimetica auch in den Einzelheiten identisch reagieren. Es wurde daher die Auffassung vertreten, daß auch Cocain seine Effekte auf sympathomimetische Amine wahrscheinlich durch Ausschaltung oder Dämpfung sympathischer Nervenendigungen ausübt, d. h. eine Art „pharmakologische Denervierung" erzeugt.

* Herrn Prof. Dr. F. Eichholtz zum 65. Geburtstag in Dankbarkeit gewidmet.

** Eine vorläufige Mitteilung erfolgte am 5. 8. 1952 auf der 16. Tagung der deutschen Pharmakologischen Gesellschaft in Göttingen [Arch. exper. Path. u. Pharmakol. 218, 117 (1953)]. Über weitere Teilergebnisse wurde auf dem 59. Kongreß der Deutsch. Ges. f. Inn. Med. Wiesbaden 1953 (vgl. Verhandlungen S. 17—22) berichtet.

In diametralem Gegensatz zu den sympathomimetischen Stoffen aus der Brenzkatechin-Reihe steht nach Untersuchungen von Fleckenstein u. Burn (1952/53) eine Gruppe anderer Sympathomimetica, die nach Denervierung der Nickhaut ihre Effekte weitgehend verlieren (Tyramin, Phenyläthylamin, Benzedrin, Pervitin, Veritol u. a.).

Während z. B. nach operativer Entfernung des Ganglion cervicale superius die Empfindlichkeit der Nickhaut für Noradrenalin im Laufe von 3—4 Tagen gewaltig ansteigt, erlischt die Wirkung von Pervitin und Benzedrin vollständig. Voraussetzung für die sympathomimetischen Effekte von Benzedrin und Pervitin ist demnach die Funktionstüchtigkeit der postganglionären sympathischen Fasern: Benzedrin, Pervitin und die anderen Stoffe dieser Gruppe sind offenbar „*Neuro-Sympathomimetica*" (Fleckenstein, 1953) ohne direkte Angriffspunkte an der glatten Muskulatur; ihre Wirksamkeit sinkt daher hochgradig ab, wenn die postganglionären Sympathicus-Fasern nach der Exstirpation des Ganglions degenerieren.

Die folgenden Untersuchungen sollten klären:

a) ob die Wirkung dieser Neuro-Sympathomimetica — ähnlich wie durch Denervierung — auch durch Cocain abgeschwächt wird,

b) ob auch bei Verwendung der Neuro-Sympathomimetica Anhaltspunkte für die Annahme einer „pharmakologischen Denervierung" durch Cocain zu gewinnen sind.

Experimenteller Teil.

Methode.

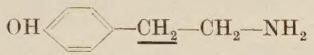
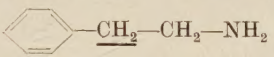
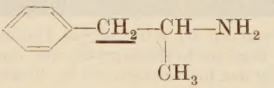
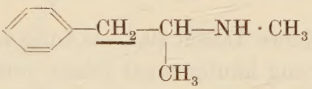
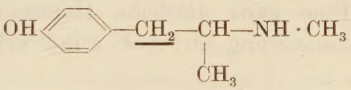
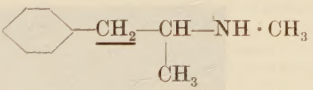
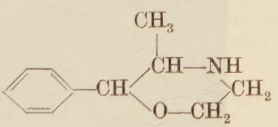
Für die Untersuchungen wurden Katzen von 2—3 kg verwendet. Die Denervierung der Nickhaut erfolgte in aseptischer Operation durch einseitige Exstirpation des re. Ganglion cervicale superius. Um Infektionen der Operationswunde zu verhüten, wurde anschließend für 3 Tage Penicillin gegeben. Die Katzen wurden dann im allgemeinen 3—30 Tage nach der Denervierung in den eigentlichen Versuch genommen. Dabei wurde das Cervical-Mark nach der Methode von Dale (genaue Beschreibung siehe Burn, Finney u. Goodwin) in Äthernarkose ohne Abklemmung der Carotiden durchtrennt, das Gehirn zerstört und das foramen occipitale mit Plastelin und einem kleinen Korken verschlossen. Anschließend wurde das Narkoticum abgesetzt und künstliche Beatmung durchgeführt. Bei einem Teil der Katzen wurde der Hals-Sympathicus auf der li. (nicht denervierten) Seite akut präganglionär durchschnitten. Bei anderen Tieren blieb der Sympathicus intakt. Nach Befestigung des Kopfes wurden dann dünne Fäden durch beide Nickhäute gezogen, so daß ihre Kontraktionen mit isotonischen Hebeln (Stirnschreibung) mit 7,4facher Vergrößerung registriert werden konnten. Der Blutdruck wurde an der li. A. femoralis gemessen; die Injektionen wurden in die re. V. femoralis gegeben. Die Cocain-Dosen betrugen — ebenso wie bei unseren früheren Versuchen — 15—25 mg/Katze bei langsamer i.v.-Injektion in etwa 10 min. Von den einzelnen sympathomimetischen Stoffen wurden jeweils 6 Dosen hintereinander i.v. injiziert, wobei die folgende Dosis jeweils das Doppelte der vorausgegangenen Dosis betrug. Für jedes Sympathomimeticum wurden auf diese Weise Diagramme ermittelt, aus denen die Nickhaut-Reaktionen über den gesamten Dosierungsbereich der verwendeten Sympathomimetica ersichtlich sind. Die Ergebnisse stützen sich auf Experimente an insgesamt 160 Katzen. In die Berechnung der Mittelwertskurven wurde eine

Anzahl von Versuchen einbezogen, die von dem einen von uns (Fle.) zusammen mit Herrn Prof. J. H. Burn[1] noch am Dept. of Pharmacology der Universität Oxford 1952 durchgeführt wurden.

Ergebnisse.

Die Sympathomimetica, deren Nickhautwirkung nach Exstirpation des Ganglion cervicale superius hochgradig abnimmt, sind in Tab. 1 zusammengestellt. Alle diese Substanzen sind insofern chemisch einheitlich, als sie im Ring höchstens noch 1 OH-Gruppe in p-Stellung besitzen und am β-Kohlenstoffatom der Seitenkette 2 H-Atome tragen. Völlig abweichend ist die Struktur der Substanz A 66 (= 2 Phenyl-3-methylmorpholin oder 2 Phenyl-3-methyl-tetrahydro-1,4-oxazin), bei der die übliche N-haltige Seitenkette durch den Morpholin-Ring ersetzt ist (vgl. Thomä u. Wick, 1954).

Tabelle 1.

Tyramin	
Phenyläthylamin	
Benzedrin (Amphetamine)	
Pervitin, Isophen	
Veritol	
1-Cyclohexyl-2-methylaminopropan	
A_{66} = 2-Phenyl-3-methylmorpholin	

a) Tyramin. Über die veränderte Wirksamkeit von Tyramin nach operativer Denervierung der Nickhaut ist erst kürzlich von Flecken-stein u. Burn (1952/53) näher berichtet worden. Als Beispiel sind in Abb. 1 die Kontraktionen einer denervierten (rechten) und einer nicht denervierten (linken) Nickhaut nach i.v.-Injektion steigender Dosen von Tyramin wiedergegeben. Auch die denervierte Nickhaut zeigt in diesem

[1] Für die Überlassung dieses Materials sind wir Herrn Prof. Dr. J. H. Burn sehr zu Dank verpflichtet.

Versuch eine Reaktion auf i.v.-injiziertes Tyramin. Die Stärke dieses Effektes bleibt jedoch weit hinter der Reaktion der normalen Nickhaut zurück. Charakteristisch ist, daß nach Degeneration der postganglionären sympathischen Fasern auch mit hohen Dosen Tyramin (1,6—3,2 mg i.v./Katze) keine kräftigen Kontraktionen mehr erzeugt werden können.

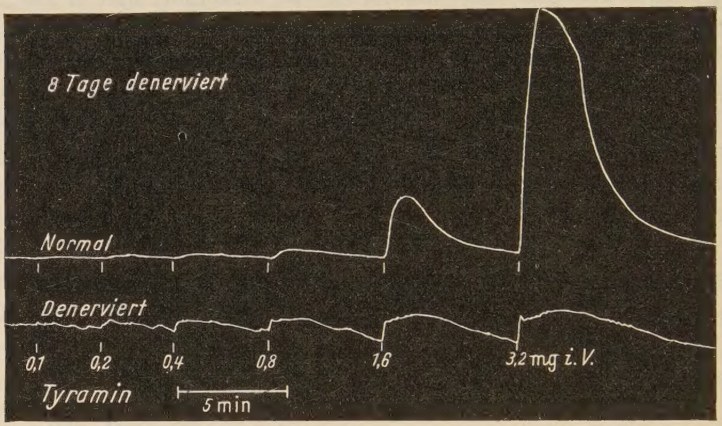


Abb. 1. Vergleich der Wirkung von Tyramin an der normalen und denervierten Nickhaut. Katze ♂, 2,6 kg, 8 Tage nach Exstirpation des Ganglion cervicale superius der re. Seite. Gleichzeitig Registrierung der Bewegungen der re. Nickhaut (denerviert) und der li. Nickhaut (nicht denerviert).

Kleinere Dosen (0,1—0,4 mg i.v./Katze) werden dagegen durch Denervierung häufig sogar leicht verstärkt.

Eine ganz ähnliche Hemmung der Tyraminwirkung tritt nach Cocainisierung ein: Abb. 2 läßt erkennen, daß Cocain (3 × 5 mg i.v.) die

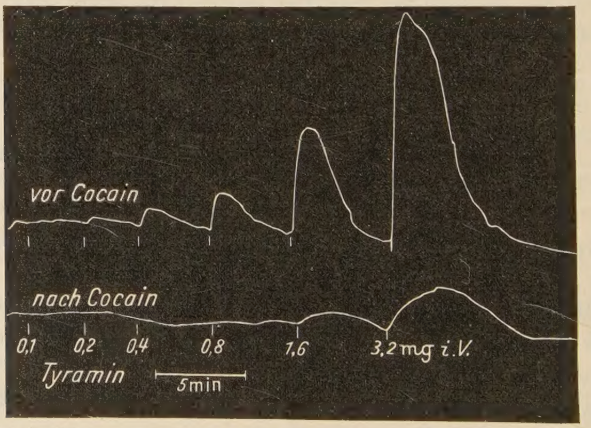


Abb. 2. Vergleich der Wirkung von Tyramin an der normalen und cocainisierten Nickhaut. Katze ♂, 3 kg. Registrierung der Bewegungen der gleichen (li.) Nickhaut vor und nach i.v.-Injektion von 5 mg/kg Cocain.

Tyramineffekte fast noch stärker als die chronische Denervierung abschwächen kann. Cocain löscht z. B. kleinere Tyramindosen (0,1 bis 0,4 mg) meist vollständig aus, während sich denervierte Nickhäute im gleichen Tyramin-Dosierungsbereich gewöhnlich noch etwas kontrahieren. In Abb. 3 sind die Mittelwerte der Kontraktionen von 29 normalen, 15 denervierten und 14 cocainisierten Nickhäuten bei i.v.-Injektion von 0,1—3,2 mg Tyramin wiedergegeben. Diese Diagramme lassen die prinzipielle Übereinstimmung zwischen dem Verhalten der denervierten und cocainisierten Nickhäute bei einer größeren Zahl von Versuchstieren ohne Schwierigkeit erkennen. Die Nickhaut verhält sich also ähnlich wie die Pupille, wo Tyramin im Anschluß an die Denervierung oder Cocainisierung wirkungslos wird (The cocaine paradox nach Burn u. Tainter, 1931).

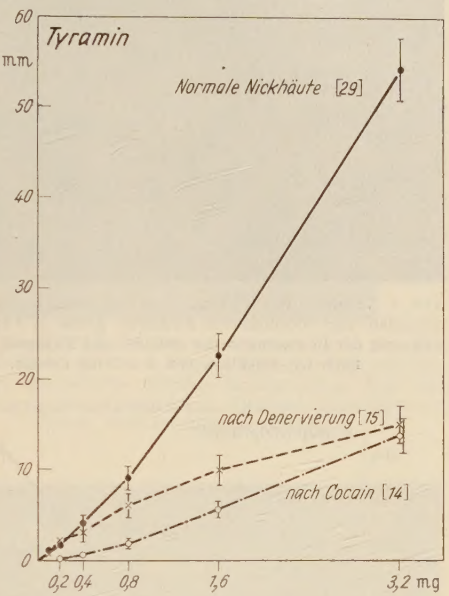


Abb. 3. Wirkungsabnahme von Tyramin an der denervierten bzw. cocainisierten Nickhaut der Katze. Mittlere Kontraktionswirkung von 0,1 bis 3,2 mg Tyramin (als Base berechnet) i.v. an 29 normalen, 15 denervierten und 14 cocainisierten Nickhäuten. Bei den einzelnen Kurvenpunkten ist jeweils der mittlere Fehler des Mittelwertes angegeben (Hebelvergrößerung 7,4).

Die vorliegenden Befunde erscheinen deshalb wichtig, weil der Tyramin-Effekt an der Nickhaut nach einer Angabe von Bacq bei Hunden durch Cocain abgeschwächt, dagegen durch Denervierung gesteigert werden soll. Diese Angabe von Bacq steht mit unseren Ergebnissen bei der Katze — zumindest für den Dosierungsbereich von 1,6—3,2 mg Tyramin — in Widerspruch. Auch Bülbring u. Burn (1938) konnten die Ergebnisse von Bacq (1937) in diesem Punkt nicht bestätigen.

Es gibt jedoch sicher Zustände, bei denen eine Steigerung der Tyramin-Wirkung nach Eingriffen am Hals-Sympathicus beobachtet werden kann, z. B. 24 bis 48 Std nach präganglionärer Durchtrennung (Innes u. Kosterlitz [1954]). Auch nach der Entfernung des Ganglion cervicale superius ist der Tyramin-Effekt im Laufe der ersten 24 Std fast regelmäßig stärker als normal (Fleckenstein u. Burn [1952/53])). Chronisch denervierte Nickhäute reagieren dagegen fast ausnahmslos in der von uns angegebenen Weise.

Auch die vorliegenden Versuche mit Tyramin lassen also wenig Zweifel, daß Cocain eine normale Nickhaut in einen Zustand versetzen kann, der dem Bild einer chronisch denervierten Nickhaut in den wesentlichen Punkten entspricht.

b) Phenyläthylamin. β-Phenyläthylamin steht dem Tyramin sehr nahe; es ist etwa 5 mal schwächer als Tyramin, führt aber in entsprechend höherer Dosis zu Nickhaut-Kontraktionen, die nach Form, Intensität und Reversibilität von Tyramin kaum unterscheidbar sind. *Die Übereinstimmung mit Tyramin zeigt sich vor allem auch an der denervierten und cocainisierten Nickhaut*; *denn Phenyläthylamin wirkt hier ebenfalls nur sehr schwach* (vgl. Abb. 4). Die Mittelwerte der Phenyläthylamin-Kontraktionen an 18 normalen, 5 denervierten und 12 cocainisierten Nickhäuten sind in Abb. 5 dargestellt. Auch Phenyläthylamin wird — ähnlich wie Tyramin — in geringen Dosen (1—4 mg/Katze) durch Cocain stärker als durch Denervierung abgeschwächt.

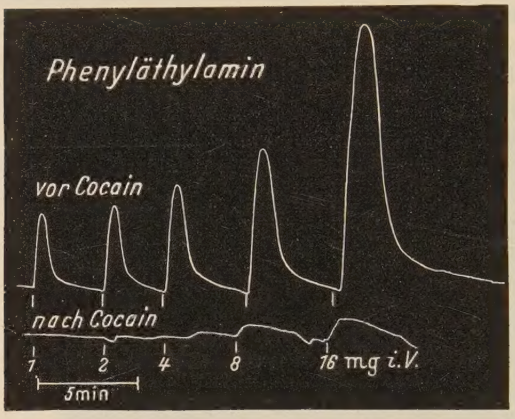


Abb. 4. Vergleich der Wirkung von Phenyläthylamin an der normalen und cocainisierten Nickhaut. Katze ♀, 3 kg. Registrierung der Bewegungen der gleichen (li.) Nickhaut vor und nach i.v.-Injektion von 4 × 5 mg Cocain.

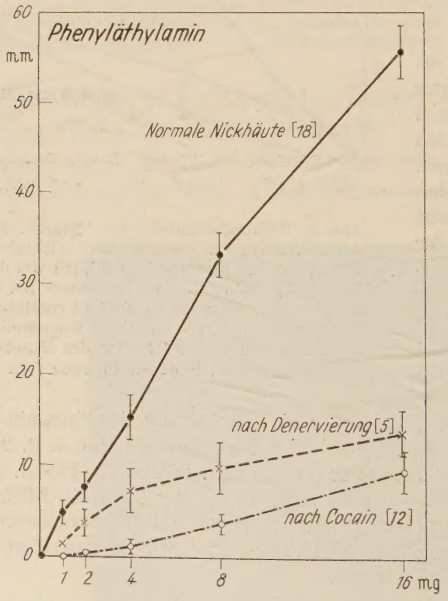


Abb. 5. Wirkungsabnahme von Phenyläthylamin an der denervierten bzw. cocainisierten Nickhaut der Katze. Mittlere Kontraktionswirkung von 1—16 mg Phenyläthylamin i.v. an 18 normalen, 5 denervierten und 12 cocainisierten Nickhäuten. Bei den einzelnen Kurvenpunkten ist jeweils der mittlere Fehler des Mittelwerts angegeben. (Hebelvergrößerung 7,4.)

Von Interesse ist, daß Phenyläthylamin bei der Spinalkatze starke zentralstimulierende Eigenschaften besitzt. Sehr häufig treten daher Erregungszustände bzw. Konvulsionen unmittelbar nach der i.v.-Injektion auf. Auch die sympathomimetischen Effekte an der normalen Nickhaut scheinen zum Teil auf zentralen Impulsen zu beruhen, denn nach akuter präganglionärer Durchschneidung des Hals-Sympathicus nimmt die Größe der Nickhaut-Kontraktionen in vielen Fällen

etwas ab. Bei Tyramin war die akute präganglionäre Durchschneidung niemals in diesem Sinne wirksam.

c) Benzedrin und Pervitin. Eine normale Nickhaut geht unter dem Einfluß von Benzedrin und Pervitin für einige Stunden in Kontraktur. Verabfolgt man hintereinander steigende Dosen (0,1—3,2 mg i.v./Katze), so summieren sich die Wirkungen der Einzelgaben zu einer maximalen Verkürzung (vgl. Abb. 6). Dieser starke Nickhauteffekt geht nach Degeneration der sympathischen Fasern (etwa 3—4 Tage nach der Exstirpation des Ganglions) praktisch vollständig verloren (Flekkenstein u. Burn, 1952/53). Selbst mit hohen Benzedrin- und Pervitingaben (über 3 mg) kann dann in den meisten Fällen keine nennenswerte mechanische Reaktion ausgelöst werden. Unsere jetzigen Versuche zeigen, daß auch Cocain wieder im gleichen Sinne wie die Denervierung wirkt: Nach einer vorausgegangenen Cocaingabe reagiert die Nickhaut auf Benzedrin und Pervitin nur noch sehr wenig. An einer normalen Nickhaut wirkt Cocain — auf der Höhe

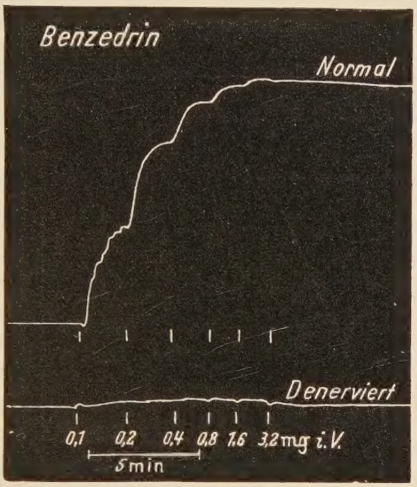


Abb. 6. Vergleich der Wirkung von Benzedrin an der normalen und denervierten Nickhaut. Katze ♀, 2,6 kg, 11 Tage nach Exstirpation des Ganglion cervicale superius der re. Seite. Registrierung der Bewegungen der re. Nickhaut (denerviert) und der li. Nickhaut (nicht denerviert).

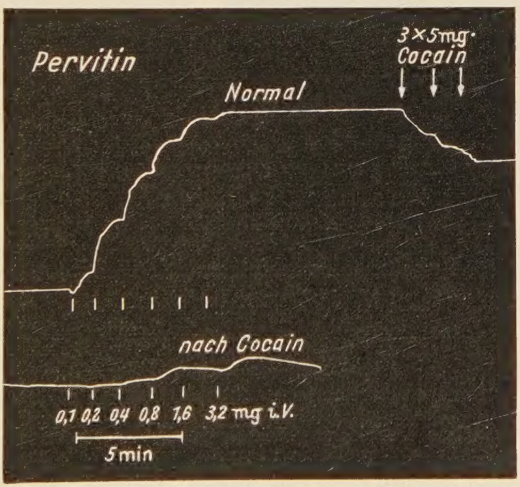


Abb. 7. Vergleich der Wirkung von Pervitin an einer normalen und an einer cocainisierten Nickhaut. 2 gleichschwere Katzen ♂, 2,5 kg. Die eine Katze erhielt zunächst kein Cocain, die andere 3 × 5 mg Cocain i.v. Durch die Cocain-Vorbehandlung wird die Kontraktionswirkung von Pervitin erheblich abgeschwächt. Nachträgliche Cocainisierung mit 3 × 5 mg Cocain auf der Höhe der Pervitin-Kontraktur wirkt weniger abschwächend als die Cocain-Vorbehandlung.

der Benzedrin- bzw. Pervitinkontraktur gegeben — erschlaffend. Der antagonistische Effekt von Cocain gegenüber Pervitin ist jedoch bei dieser Versuchsanordnung erheblich schwächer als bei vorausgegangener Cocainisierung (vgl. Abb. 7). Die Mittelwerte der Kontraktionen von 5 normalen, 5 denervierten und 5 cocainisierten Nickhäuten sind in Abb. 8 zusammengestellt.

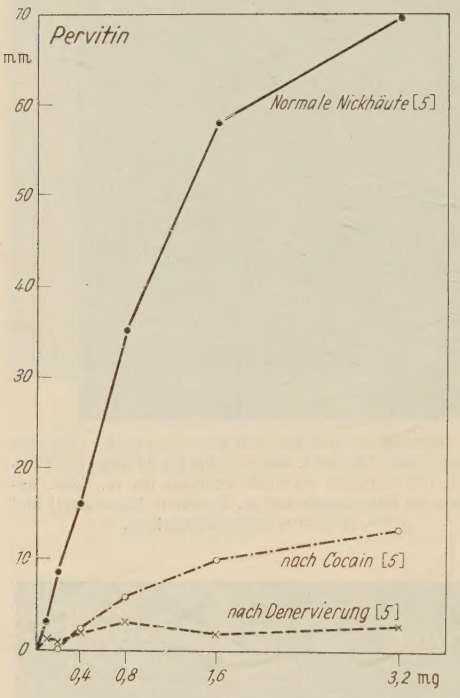


Abb. 8. Wirkungsabnahme von Pervitin an der denervierten bzw. cocainisierten Nickhaut der Katze. Mittlere Kontraktionswirkung von 0,1—3,2 mg Pervitin i.v. an 5 normalen, 5 denervierten und 5 cocainisierten Nickhäuten (Hebelvergrößerung 7,4).

d) Veritol und andere Substanzen. Über den antagonistischen Einfluß von Cocain gegenüber der Veritolwirkung auf die Nickhaut ist schon früher kurz berichtet worden (Fleckenstein, 1953). Veritol (0,1 bis 3,2 mg/Katze) erzeugt eine langdauernde Nickhautkontraktur, die dem Pervitin und Benzedrin weitgehend entspricht. Dagegen kontrahieren sich chronisch denervierte sowie cocainisierte Nickhäute nur noch schwach (vgl. Tab. 2). Außer Veritol wurden noch 4 weitere Substanzen (darunter das psychisch stimulierende Cyclohexylmethylaminopropan) geprüft, die die gleiche Seitenkette wie Veritol besitzen. Auch diese Substanzen verhielten sich nach Denervierung und Cocainisierung analog dem Veritol bzw. Pervitin.

Besonderes Interesse kann in diesem Zusammenhang die Substanz A 66 (= 2-Phenyl-3-methyl-morpholin) beanspruchen, deren Seitenkette von den anderen sympathomimetischen Stoffen abweicht (vgl. Tab. 1).

Diese Verbindung ähnelt in ihrem psychisch-stimulierenden und sonstigen Eigenschaften dem Benzedrin und Pervitin (vgl. Thomä u. Wick, 1954) und ist daher kürzlich unter dem Namen „Preludin" als Appetit-Zügler und Anti-Depressivum in die Therapie eingeführt worden. Der praktische Vorteil dieser Substanz scheint darin zu liegen, daß die zentralen Effekte und die Kreislaufwirkungen schwächer sind als bei Benzedrin und Pervitin.

Tatsächlich ist A 66 auch entsprechend seiner Wirkung auf die Nickhaut in die Gruppe der Neuro-Sympathomimetica einzureihen; denn es

verursacht eine mittelstarke Dauerkontraktur, die nach chronischer Denervierung verschwindet (vgl. Abb. 9). Ähnlich abgeschwächte Nickhauteffekte sieht man nach Cocain.

Tabelle 2. *Mittlere Kontraktionshöhe (mm) von 5 normalen, 5 denervierten und 14 cocainisierten Nickhäuten bei i.v.-Injektion von 0,1—3,2 mg Veritol (Hebelvergrößerung: 7,4).*

		mg						Zahl der Versuche
		0,1	0,2	0,4	0,8	1,6	3,2	
Veritol	normale Nickhaut	0,4 (± 0,3)	0,8 (± 0,2)	3,4 (± 0,5)	34,2 (± 0,8)	74,5 (± 4,4)	84,6 (±5,4)	5
	denervierte Nickhaut	1,8 (± 1,1)	5,4 (± 3,3)	6,6 (± 4,0)	9,0 (± 4,1)	11,2 (± 3,5)	20,0 (± 3,8)	5
	cocainisierte Nickhaut	0,1 (± 0,1)	0,8 (± 0,5)	3,1 (± 1,6)	7,4 (± 2,8)	13,7 (± 3,9)	21,3 (± 4,3)	14

e) Vergleichsversuche mit „Intermediär-Stoffen" (Ephedrin, p-Sympatol, β-Phenyläthanolamin). Die Sympathomimetica der Brenzkatechin-Reihe einerseits und die Neuro-Sympathomimetica andererseits stellen Extreme dar. Eine Gruppe anderer Sympathomimetica steht zwischen beiden Gruppen (Fleckenstein u. Burn, 1952/53). Solche Intermediär-Stoffe sind Ephedrin, β-Phenyläthanolamin, p-Sympatol[1], Suprifen, β-p-Oxyphenyläthanolamin; sie werden durch Denervierung weder verstärkt noch beträchtlich abgeschwächt und unterscheiden sich von der Gruppe der Neuro-Sympathomimetica lediglich durch den Besitz einer OH-Gruppe am ersten C-Atom der Seitenkette (nächst dem Ring).

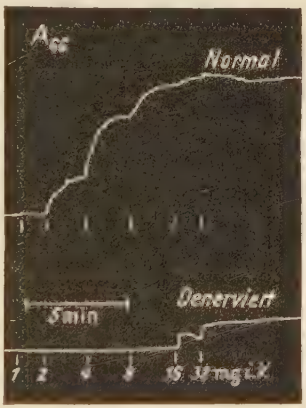


Abb. 9. Vergleich der Wirkung von A 66 an der normalen und denervierten Nickhaut. Katze 2,5 kg, 6 Tage nach Exstirpation des re. Ganglion cervicale superius. Registrierung der Bewegungen der re. Nickhaut (denerviert) und der li. (nicht denerviert).

Auch die Intermediär-Substanzen werden durch Cocain in ähnlicher Weise wie durch Denervierung beeinflußt. In Tab. 3 sind als Beispiel die mittleren Kontraktionshöhen normaler, denervierter und cocainisierter Nickhäute bei i.v.-Injektion steigender Dosen von Ephedrin, p-Sympatol und β-Phenyläthanolamin wiedergegeben. Die denervierten und cocainisierten Nickhäute bleiben fast in allen Fällen etwas hinter den normalen Nickhäuten zurück. Man muß daraus den Eindruck gewinnen,

[1] m-Sympatol (Neosynephrine, Adrianol) wird im Gegensatz zum p-Sympatol durch Cocain und Denervierung verstärkt (vgl. Fleckenstein u. Bass [1953]).

daß die Intermediärstoffe den neurosympathomimetischen Substanzen näherstehen als den Stoffen aus der Brenzkatechin-Reihe. Die Grenze zwischen der Gruppe der Intermediärstoffe und der Neuro-Sympathomimetica ist jedoch meist ohne Schwierigkeit zu ziehen; denn die Abschwächung an der denervierten bzw. cocainisierten Nickhaut erreicht nie das bei Injektion der Neuro-Sympathomimetica beobachtete Ausmaß.

Tabelle 3. *Mittlere Kontraktionshöhe von normalen, denervierten und cocainisierten Nickhäuten bei i.v.-Injektion ve schiedener Sympathomimetica aus der Intermediär-Gruppe (Hebelvergrößerung: 7,4).*

		mg						Zahl der Versuche
		1	2	4	8	16	32	
Ephedrin	normale Nickhaut	16,7 (± 3,5)	46,7 (± 7,8)	62,0 (± 8,5)	67,3 (± 7,8)	70,5 (± 7,5)	67,5 (± 8,1)	6
	denervierte Nickhaut	15,3 (± 3,6)	29,5 (± 5,0)	48,3 (± 7,1)	66,0 (±11,5)	73,4 (± 12,1)	64,3 (± 6,7)	6
	cocainisierte Nickhaut	6,1 (± 1,6)	17,4 (± 2,5)	31,4 (± 1,5)	41,5 (± 1,8)	46,6 (± 2,7)	48,5 (± 2,6)	6
		0,1	0,2	0,4	0,8	1,6	3,2	
p-Sympatol	normale Nickhaut	0,6 (± 0,2)	2,2 (± 0,7)	5,3 (± 1,1)	13,5 (± 1,0)	25,1 (± 1,3)	42,0 (± 1,6)	9
	denervierte Nickhaut	3,4 (± 2,0)	5,2 (± 1,5)	10,4 (± 3,0)	17,5 (± 4,4)	27,4 (± 3,9)	36,6 (± 4,2)	4
	cocainisierte Nickhaut	0,9 (± 0,4)	2,0 (± 0,5)	4,4 (± 0,8)	8,8 (± 1,4)	17,3 (± 2,1)	29,4 (± 2,9)	8
β-Phenyl-äthanolamin	normale Nickhaut	1,0 (± 0,4)	2,9 (± 0,9)	6,1 (± 1,5)	11,9 (± 2,2)	21,3 (± 3,0)	33,3 (± 3,5)	8
	denervierte Nickhaut	3,5 (± 1,8)	3,4 (± 1,5)	7,1 (± 2,2)	11,0 (± 2,9)	16,5 (± 3,6)	23,3 (± 4,4)	4
	cocainisierte Nickhaut	1,4 (± 0,5)	2,9 (± 0,7)	4,9 (± 1,1)	7,9 (± 1,3)	12,9 (± 1,8)	20,5 (± 2,2)	8

Besprechung.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen zunächst, daß alle geprüften Neuro-Sympathomimetica auch durch i.v.-Cocainisierung stark abgeschwächt werden. *Denervierte und cocainisierte Nickhäute reagieren also auch gegenüber den Stoffen aus der Gruppe der Neuro-Sympathomimetica im Prinzip ähnlich.* Diese auffälligen Befunde sind — wie schon früher näher begründet wurde — am einfachsten so zu deuten,

daß Cocain die Aktivität der sympathischen Nervenendigungen bedeutend herabsetzt und damit den Zustand nach Degeneration der sympathischen Fasern akut imitiert. Auf die Übereinstimmung zwischen den Reaktionen denervierter und cocainisierter Nickhäute ist neuerdings auch von Innes u. Kosterlitz (1954) hingewiesen worden.

1. Zum Wirkungsmechanismus der Sympathomimetica.

Mit Hilfe von Cocain gelingt es — ebenso wie mit Hilfe der Denervierung — tiefgreifende Unterschiede im Wirkungsmechanismus sympathomimetischer Stoffe aufzudecken. Die größten Gegensätze treten dabei zwischen der Gruppe der Neuro-Sympathomimetica und den sympathomimetischen Substanzen aus der Brenzkatechin-Reihe zutage: Die Sympathomimetica der Brenzkatechin-Reihe wirken auf die glatte Muskulatur der Nickhaut direkt und werden durch Cocain und Denervierung potenziert.

Über den feineren Mechanismus dieser Wirkungsverstärkung herrscht noch keine genügende Klarheit. Man kann jedoch annehmen, daß die sympathisch innervierte Nickhaut-Muskulatur im Normalzustand an die chemische Überträger-Substanz Noradrenalin akkommodiert ist; diese Akkommodation verschwindet, sobald die Noradrenalin-Sekretion der sympathischen Nervenendigungen bei Degeneration der Fasern oder nach Cocainisierung zurückgeht. Als Folge können dann übersteigerte Reaktionen auf Noradrenalin und die — dem Noradrenalin nahestehenden — Sympathomimetica der Brenzkatechin-Reihe erwartet werden.

Die Effekte der Neuro-Sympathomimetica scheinen dagegen auf einem anderen Wege zustande zu kommen: *Diese Stoffe wirken am Erfolgsorgan hauptsächlich indirekt, d. h. erst durch Zwischenschaltung der postganglionären Nervenfasern.* Man muß dabei vor allem an 2 Möglichkeiten denken:

a) Die Neuro-Sympathomimetica könnten die sympathischen Nervenendigungen in Erregung versetzen und so zu einer erhöhten Abgabe des chemischen Überträgerstoffs, d. h. Noradrenalin, führen.

b) Die Neuro-Sympathomimetica könnten den Abbau des kontinuierlich freigesetzten Noradrenalin hemmen, so daß Noradrenalin an den Nervenendigungen kumuliert. Tatsächlich stellen die Neuro-Sympathomimetica vom Typ Benzedrin, Pervitin, Veritol starke Hemmstoffe der Aminoxydase[1] dar (Blaschko); sie sind daher unter Umständen mit Eserin zu vergleichen, das durch Hemmung der Cholinesterase Acetylcholin zur Anreicherung bringt.

Welcher der beiden Mechanismen für die Neuro-Sympathomimetica zutrifft, kann noch nicht entschieden werden; in jedem Falle wäre jedoch der Effekt der Neuro-Sympathomimetica indirekt und an die Anwesenheit bzw. Freisetzung des

[1] Tyramin und Phenyläthylamin sind bevorzugte Substrate der Aminoxydase. Es ist daher nicht unwahrscheinlich, daß auch Tyramin und Phenyläthylamin den Noradrenalin-Abbau durch Verdrängung des Noradrenalin vom Ferment vorübergehend beeinträchtigen können.

natürlichen Überträgerstoffs geknüpft. *Die Neuro-Sympathomimetica müßten daher ihre Wirksamkeit verlieren, wenn die degenerierenden oder cocainisierten Nervenendigungen die Noradrenalin-Produktion einstellen.* Es ist bemerkenswert, daß sich die vollen Denervierungseffekte im gleichen Zeitraum von 3 Tagen entwickeln, in dem nach Untersuchungen von U. S. v. Euler u. Purkhold (1952) der Noradrenalin-Gehalt in denervierten Organen (Milz, Niere, Leber) bis auf wenige Prozent der Norm absinkt. *Für die Wirkungsabschwächung der Neuro-Sympathomimetica könnte demnach der gleiche Noradrenalin-Schwund ausschlaggebend sein, der unter Umständen auch die Empfindlichkeitssteigerung für Brenzkatechin-Derivate erklärt.* Von Interesse ist jedoch, daß die Sensibilisierung der Nickhaut für Brenzkatechin-Derivate schon nach Injektion sehr kleiner Cocain-Dosen (etwa 0,25 mg/kg) beginnt, während die Abschwächung der Neuro-Sympathomimetica wesentlich höhere Dosen erfordert.

Die Intermediärstoffe scheinen sowohl direkte Angriffspunkte an der glatten Muskulatur zu besitzen als auch Wirkungen nach Art der Neuro-Sympathomimetica. Nach Denervierung oder Cocainisierung werden dann vermutlich die direkten Effekte an den Muskelfasern verstärkt, während die indirekten Wirkungen über die sympathischen Nervenfasern ausfallen. Verstärkung und Abschwächung könnten sich daher bei den Intermediärstoffen die Waage halten, so daß unter dem Einfluß von Cocain und Denervierung keine hochgradigen Änderungen in der Wirkungsstärke sichtbar zu werden brauchen. Auffällig ist, daß sich denervierte Nickhäute bei Injektion der Intermediärstoffe, z. B. Ephedrin, meist rascher kontrahieren als normale Nickhäute. Dies dürfte auf eine gewisse Sensibilisierung auch für Intermediärstoffe hinweisen; cocainisierte Nickhäute zeigten dieses Phänomen weniger deutlich.

2. Einteilung der Sympathomimetica.

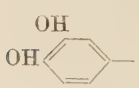
Die Experimente an denervierten und cocainisierten Nickhäuten führen zu einer zwanglosen Einteilung der wichtigsten Sympathomimetica nach dem Wirkungsmechanismus und der chemischen Konstitution

a) *Brenzkatechin-Derivate.* Wesentlich für die Wirkungsverstärkung sind die 2 OH-Gruppen im Ring; die Struktur der Seitenkette kann dagegen ziemlich variieren.

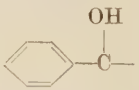
b) *Neuro-Sympathomimetica.* Sie besitzen im Ring höchstens noch 1 OH-Gruppe in p-Stellung. Entscheidend ist bei ihnen die chemische Konfiguration am β-Kohlenstoff-Atom der Seitenkette (C-Atom nächst dem Ring); dieses C-Atom trägt 2 H-Atome.

c) *Intermediär-Stoffe.* Sie unterscheiden sich von der Gruppe der Neuro-Sympathomimetica durch den Besitz einer OH Gruppe am β-Kohlenstoff-Atom der Seitenkette.

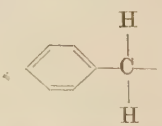
Für die pharmakologische Wirkung sind also folgende Strukturen von Bedeutung (vgl. Fleckenstein u. Burn):



Brenzkatechin-Derivate



Intermediär-Stoffe

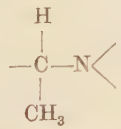


Neuro-Sympathomimetica

Die vorliegenden Versuche zeigen, daß sich diese Einteilung jetzt ebenso auf Experimente mit Cocain wie auf Untersuchungen an denervierten Nickhäuten stützen kann.

Die Sympathomimetica mit 1 OH-Gruppe im Ring sind nicht einheitlich; sie gehören teils in die Reihe der Neuro-Sympathomimetica (Veritol, Tyramin), teils in die Reihe der Intermediär-Stoffe (p-Sympatol, Suprifen, β-Oxyphenyläthanolamin). Wirkungsmäßig muß m-Sympatol (= Neosynephrine, Adrianol) sogar den Brenzkatechin-Derivaten zugerechnet werden. Ebenso müssen die Sympathomimetica ohne OH-Gruppe im Ring in Neuro-Sympathomimetica (Phenyläthylamin, Benzedrin, Pervitin, Cyclohexylaminopropan) und in Intermediär-Stoffe (Ephedrin, β-Phenyläthanolamin) aufgeteilt werden. Eine OH-Gruppe in p-Stellung ist also viel weniger bedeutungsvoll als der Besitz einer OH-Gruppe am β-Kohlenstoff-Atom der Seitenkette.

Die vorliegende Einteilung richtet sich ausschließlich nach pharmakologisch interessierenden Kriterien. Sie berücksichtigt dagegen nicht die — für die Praxis häufig viel wichtigere — *Wirkungsdauer*. Auch hier ergibt sich jedoch aus den Versuchen an der Nickhaut eine ziemlich durchsichtige Abhängigkeit von der chemischen Konstitution: Alle geprüften Sympathomimetica der Brenzkatechin-Reihe werden nach intravenöser Injektion rasch inaktiviert; die Nickhaut-Kontraktionen klingen daher auch nach hohen Dosen in wenigen Minuten ab. Die Wirkungsdauer der Neuro-Sympathomimetica und der Intermediär-Stoffe ist dagegen sehr verschieden. Tyramin und Phenyläthylamin wirken z. B. — ähnlich wie die Brenzkatechin-Derivate — nur ganz kurz; Benzedrin, Pervitin, Cyclohexylaminopropan, Veritol, Ephedrin, Suprifen erzeugen dagegen unter Umständen stundenlang dauernde Nickhautkontraktionen. Entscheidend hierfür ist offenbar die Geschwindigkeit des Abbaues durch die Aminoxydase; dieses Ferment greift am α-Kohlenstoff-Atom der Seitenkette (2. C-Atom vom Ring aus gerechnet) an: Stoffe wie Tyramin und Phenyläthylamin mit der Seitenkette $—CH_2—CH_2—NH_2$ werden von der Aminoxydase sehr rasch zerstört. p-Sympatol, β-Phenyläthanolamin und β-Oxyphenyläthanolamin mit der Seitenkette $—CH(OH)—CH_2—NH_2$ bzw. $—CH(OH)—CH_2—NH—CH_3$ werden etwas langsamer als Tyramin und Phenyläthylamin abgebaut (Alles u. Heegaard, 1943); Heegaard u. Alles, 1943). Dementsprechend klingt auch die Nickhaut-Wirkung dieser Substanzen nicht ganz so rasch wie bei Tyramin und Phenyläthylamin ab. Benzedrin, Pervitin, Cyclohexylaminopropan, Veritol, Ephedrin, Suprifen besitzen dagegen am α-C-Atom der Seitenkette die Konfiguration



Solche Stoffe sind gegen die Aminoxydase resistent bzw. hemmen das

Ferment (vgl. Blaschko). Mit einem vollständigen Abklingen der Nickhaut-Wirkung kann daher selbst im Laufe von Stunden nicht gerechnet werden.

Zusammenfassung.

1. Nach operativer Entfernung des ganglion cervicale superius der Katze steigt die Empfindlichkeit der Nickhaut für Sympathomimetica aus der Brenzkatechin-Reihe im Laufe von 3—4 Tagen auf ein Vielfaches der Norm an. Gleichzeitig damit büßt jedoch eine Gruppe anderer Sympathomimetica (Tyramin, Phenyläthylamin, Benzedrin, Pervitin, Cyclohexylaminopropan, Veritol, 2-Phenyl-3-methyl-morpholin) ihre Wirksamkeit an der denervierten Nickhaut weitgehend ein.

2. Ganz ähnlich wie chronische Denervierung wirken intravenöse Gaben von Cocain: Brenzkatechin-Derivate werden durch Cocain verstärkt; dagegen erleiden die Sympathomimetica, welche nach Denervierung wirkungslos werden, auch durch Cocain eine hochgradige Abschwächung. Als Erklärung wird angenommen, daß Cocain die Aktivität der sympathischen Nervenendigungen — bis zu einem der operativen Denervierung ähnlichen Grade — reduzieren kann und so eine Art „pharmakologische Denervierung" erzeugt.

3. Voraussetzung für die vollen Effekte von Tyramin, Phenyläthylamin, Benzedrin, Pervitin, Cyclohexylaminopropan, Veritol und 2-Phenyl-3-methyl-morpholin ist die Funktionstüchtigkeit der postganglionären sympathischen Nervenfasern. Die genannten Stoffe sind „Neuro-Sympathomimetica". Sie dürften entweder durch Erregung der sympathischen Nervenendigungen Noradrenalin freisetzen oder Noradrenalin durch Hemmung des Abbaues (Blockierung der Aminoxydase?) zur Kumulation bringen. Die Wirksamkeit der Neuro-Sympathomimetica sinkt daher ab, sobald die Fasern unter dem Einfluß von Cocain oder infolge der Degeneration nach Ganglien-Exstirpation ihre Noradrenalin-Produktion einstellen.

4. Die Sympathomimetica der Brenzkatechin-Reihe einerseits und die Neuro-Sympathomimetica andererseits stellen Extreme dar. Eine Anzahl anderer Sympathomimetica stehen zwischen beiden Gruppen. Solche „Intermediär-Stoffe" sind Ephedrin, β-Phenyläthanolamin, p-Sympatol, Suprifen, β-Oxyphenyläthanolamin; sie werden durch Denervierung bzw. Cocainisierung weder verstärkt noch bedeutend abgeschwächt.

5. Während die Brenzkatechin-Derivate durch den Besitz von 2 OH-Gruppen im Ring eindeutig charakterisiert sind, besitzen die Neuro-Sympathomimetica und die Intermediär-Stoffe im Ring höchstens 1 OH-Gruppe in p-Stellung. Als Unterscheidungsmerkmal muß bei ihnen die Konfiguration am β-Kohlenstoff-Atom der Seitenkette gelten. Die

Intermediär-Stoffe tragen an diesem C-Atom — anders als die Neuro-Sympathomimetica — noch eine OH-Gruppe. Die für die Wirkungsdauer der Sympathomimetica wichtigen Besonderheiten der chemischen Konstitution werden erörtert.

Literatur.

Alles, G. A., and E. V. Heegaard: Substrate specifity of amine oxidase. J. of Biol. Chem. **147**, 487 (1943). — Bacq, Z. M.: Action des amines sur la membrane nictitante et modifications de cette action par la cocaine et l'énervation. Arch. internat. Pharmacodynamie **55**, 190 (1937). — Blaschko, H.: Amine oxidase and amine metabolism. Pharmacol. Rev. **4**, 415 (1952). — Burn, J. H., D. J. Finney and L. G. Goodwin: Biological Standardisation, S. 219. London: Geoffrey Cumberlege, Oxford Univ. Press. 1950. — Burn, J. H., and M. L. Tainter: An analysis of the effect of cocaine on the actions of adrenaline and tyramine. Brit. J. Physiol. **71**, 169 (1931). — Bülbring, E., and J. H. Burn: The action of tyramine and adrenaline on the denervated nictitating membrane. Brit. J. Physiol. **91**, 459 (1938). — v. Euler, U. S., and A. Purkhold: Effect of sympathetic denervation on the noradrenaline content of the spleen, kidney and salivary glands in the scheep. Acta physiol. scand. (Stockh.) **24**, 212 (1952). — Fleckenstein, A.: Konstitution und Wirkung sympathomimetischer Amine. Neue Gesichtspunkte nach Versuchen an der normalen und denervierten Nickhaut der Katze. Pharmakologen-Kongreß Göttingen 1952, vgl. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **218**, 117 (1953). — Über Neuro-Sympathomimetica. Verh. dtsch. Ges. inn. Med. **59**, 17 (1953). — Fleckenstein, A., u. H. Bass: Zum Mechanismus der Wirkungsverstärkung und Wirkungsabschwächung sympathomimetischer Amine durch Cocain und andere Pharmaka. Die Sensibilisierung der Katzen-Nickhaut für Sympathomimetica der Brenzkatechin-Reihe. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **220**, 143 (1953). — Fleckenstein, A., and J. H. Burn: The effect of denervation on the action of sympathomimetic amines on the nictitating membrane. Brit. J. Pharmacol. **8**, 69 (1953). — Heegaard, E. V., and G. A. Alles: Inhibitor specifity of amine oxidase. J. of Biol. Chem. **147**, 505 (1943). — Innes, I. R., and H. W. Kosterlitz: The effects of preganglionic and postganglionic denervation on the responses of the nictitating membrane to sympathomimetic substances. Brit. J. Physiol. **124**, 25—43 (1954). — Thomä, O., u. H. Wick: Über einige Tetrahydro-1,4-oxazine mit sympathomimetischen Eigenschaften. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 540 (1954).

Prof. Dr. A. Fleckenstein, Pharmakolog. Institut d. Universität Heidelberg.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 224, S. 416—425 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. F. Eichholtz).

Vergleichende Untersuchungen über die Kreislauf- und Atmungswirkung der Adenosinkörper am wachen Hund*.

Von
U. Wagenmann, E. Schmid und R. Taugner.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 12. Oktober 1954.)

Vergleichende Untersuchungen über die Kreislaufwirkung von Adenosintriphosphat (ATP), Muskeladenylsäure (AMP) und Adenosin (A) wurden von zahlreichen Autoren angestellt. Die Ergebnisse weichen jedoch (offenbar bedingt durch Unterschiede in Methodik, Tiermaterial und Dosierung) in entscheidenden Punkten voneinander ab. Vor allem fehlen in älteren Untersuchungen mit „ATP" korrekte Angaben über den tatsächlichen ATP-Gehalt, wie sie neuerdings durch chromatographische Bestimmungen möglich sind. Wegen der therapeutischen Bedeutung dieses Problems schienen erneute vergleichende Untersuchungen mit Präparaten bekannter Zusammensetzung wünschenswert. Wir verwendeten dazu die Schroedersche Versuchsanordnung am wachen Hund, welche es erlaubt, die wesentlichen Reaktionen von Kreislauf und Atmung ohne Beeinflussung durch Narkose und Operation am selben Tiermaterial wiederholt zu registrieren.

Versuchsanordnung. An 2 nichtnarkotisierten, dressierten Carotisschlingenhunden registrierten wir (neben der Atmung) mit den Methoden von Schroeder Blutdruck, Arteriolen-, Capillar- bzw. Venendruck in der vorderen Extremität und bestimmten außerdem die physikalischen Kreislaufgrößen nach Wezler und Böger.

A, AMP und „ATP" wurden im Eisschrank aufbewahrt und für jeden Versuch frisch in physiologischer NaCl-Lösung (AMP und A über 1 n NaOH bzw. 1 n HCl mit anschließender Neutralisation) gelöst. Das Lösungsvolumen betrug bei Dosen bis 100 γ/kg 1 cm³, bei höheren Dosen 4 cm³, die Zeit der i.v. Injektion bei Prüfung der Atmungswirkung 15 sec, beim Studium von Kreislaufeffekten 1 min.

Nach der papierchromatographischen Bestimmung, welche wir Herrn Dr. Gerlach verdanken (vgl. Gerlach u. Weber), waren A und AMP frei von Beimengungen. „ATP" I, welches zum Vergleich mit A und AMP diente, bestand, bezogen auf den Gesamt-P-Gehalt, aus 1,75% Orthophosphat, 58,5% ATP, 15,1% ADP und 6,1% „unbekannte Fraktion", bei 18,5% nicht definierter P-Verbindungen. „ATP"

* Herrn Prof. Dr. F. Eichholtz zum 65. Geburtstag gewidmet.

II, welches zur Kontrolle der Ergebnisse mit „ATP" I diente, enthielt 4,3% Orthophosphat, 5,8% Pyrophosphat, 46,2% ATP, 21,4% ADP, 15,5% „unbekannte Fraktion", bei 6,8% nicht definierter P-Verbindungen. Beim Vergleich der molaren Wirkungsstärken legten wir für „ATP" den Gehalt an ATP + ADP zugrunde.

Versuchsergebnisse.

A, AMP und „ATP" führten beim wachen Hund an Atmung und Kreislauf zu prinzipiell gleichartigen Reaktionen. Der Effekt kleinster Dosen bestand ausschließlich in einer *Atmungserregung*. Bei Schwellendosen kam es nur zu einem tiefen Atemzug mit entsprechenden reflektorischen Veränderungen von Herzfrequenz und Blutdruck (Abb. 1, Tab. 1). Letztere treten auch bei spontanen tiefen Atemzügen auf und entsprechen einer Steigerung der normalen respiratorischen Arrhythmie. Bei Injektion höherer Dosen war die Atmung für 1—3 min vertieft und beschleunigt.

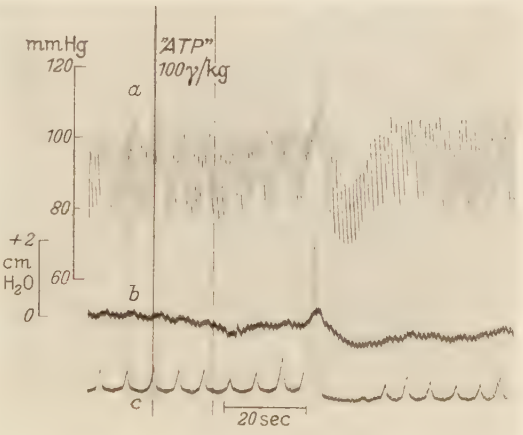


Abb. 1. Hund Hella, 22 kg. *a* Blutdruck, *b* Capillardruck, *c* Atmung. Zwischen den Lichtmarken Injektion von 100 γ „ATP" I/kg (entsprechend 58,5 γ ATP + 15,1 γ ADP/kg).

Am Kreislauf trat als erstes Symptom eine in Stärke und Dauer dosisabhängige *Tachykardie* bei verkleinerter Blutdruck-Amplitude und konstantem Mitteldruck auf. Höhere Dosen von A, AMP und „ATP" führten neben der Tachykardie auch noch zum *Blutdruckabfall* (Tab. 1). Die Tachykardie nahm im tiefsten Punkt der Blutdruckkurve unter Umständen vorübergehend etwas ab (Abb. 2 und 3). Diese „relative Bradykardie" war bei „ATP" häufiger und stärker als bei AMP und wurde bei A nur selten beobachtet. Eine echte Bradykardie mit Verminderung der Herzfrequenz auf etwa die Hälfte des Ruhewertes wurde nur in einem Versuch nach 2 mg „ATP"/kg beobachtet. Wegen des extremen Blutdruckabfalls wurden solche Dosen nicht mehr gegeben. Geringe anfängliche Blutdrucksteigerungen waren offenbar durch die geschilderten Atmungswirkungen bedingt (Abb. 2).

Auch die Kreislaufanalysen nach Wezler und Böger ergaben für A, AMP und „ATP" (neben Druckabfall, verkleinerter Amplitude und Tachykardie) prinzipiell dieselben Effekte: Deutliche Verminderung des peripheren Gefäßwiderstandes, Vermehrung des Minutenvolumens mit

vergrößertem Schlagvolumen bei einem und verkleinertem Schlagvolumen beim zweiten Tier (Abb. 3).

Die beschriebenen Veränderungen von Blutdruck und Herzfrequenz durch hohe Dosen von A, AMP sowie „ATP" (etwa ab 600 γ/kg) dauerten $1\frac{1}{2}$—3 min. Trotz Normalisierung der Herzfrequenz zeigte die respiratorische Arrhythmie oft erst einige Minuten später wieder die ursprüngliche Form (Abb. 2). Wiederholte Injektionen in Abständen von etwa 15 min führten im allgemeinen zur gleichen Reaktion. Es hatte lediglich den Anschein, als ob die erste Injektion nach einem mehrtägigen versuchsfreien Intervall etwas stärkere Effekte bewirkte.

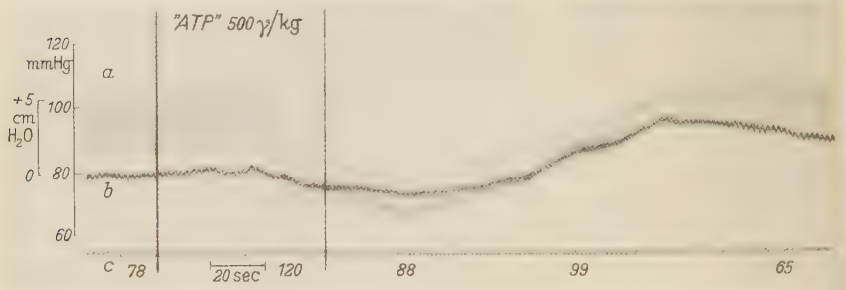


Abb. 2. Hund Senta, 26 kg. *a* Blutdruck, *b* Capillardruck, *c* Atmung. Zahlen unter der Atmungsregistrierung: Herzfrequenz/min. Zwischen den Lichtmarken Injektion von 500 γ „ATP" I/kg (entsprechend 292,5 γ ATP + 75,5 γ ADP/kg).

Die Durchblutung der vorderen Extremität wurde im Gegensatz zur starken Verminderung des peripheren Gesamtwiderstandes durch A, AMP und „ATP" nicht wesentlich vermehrt (vergl. Anschütz u. Schroeder). Blutdruckunwirksame Dosen waren ohne Effekt. Bei höherer Dosierung stiegen Arteriolen-, Capillar- und Venendruck — nach einer initialen, druckpassiven Durchblutungsverminderung — erst sekundär an (Abb. 2). Der Arteriolendruck wurde jedoch nie um mehr als 3 cm H_2O erhöht. Die Ergebnisse waren auch durch künstliche Erzeugung von Gefäßkrämpfen (Umspülung der im Plethysmographen befindlichen Extremität mit Wasser von + 4° C) nicht zu verbessern. Die Gefäßerweiterung in der Extremität schien nach A und AMP stärker zu sein als nach „ATP"-Mengen gleicher Blutdruckwirksamkeit; die relativ schwache Reaktion erlaubt jedoch keine exakte quantitative Aussage.

Zum Vergleich der Wirkungsstärken von A, AMP und „ATP" bestimmten wir in 76 Versuchen die Schwellendosen, welche a) zur Atmungserregung, b) zur Beschleunigung der Herzfrequenz um mindestens 30% und c) zu einem Abfall des Mitteldrucks um 10 mm Hg führten (Tab. 1). Die Injektion dauerte bei a) 15 sec, bei b) und c) 1 min.

Entsprechend Tab. 1 betrug bei einem Tier das Verhältnis der molaren Wirkungsstärken von A, AMP und „ATP" für a) etwa 1 : 1,3 : 2,5, für b) etwa 1 : 1,3 : 1,9 und für c) etwa 1 : 1,3 : 2,5. Dieselben Relationen fanden wir auch beim zweiten

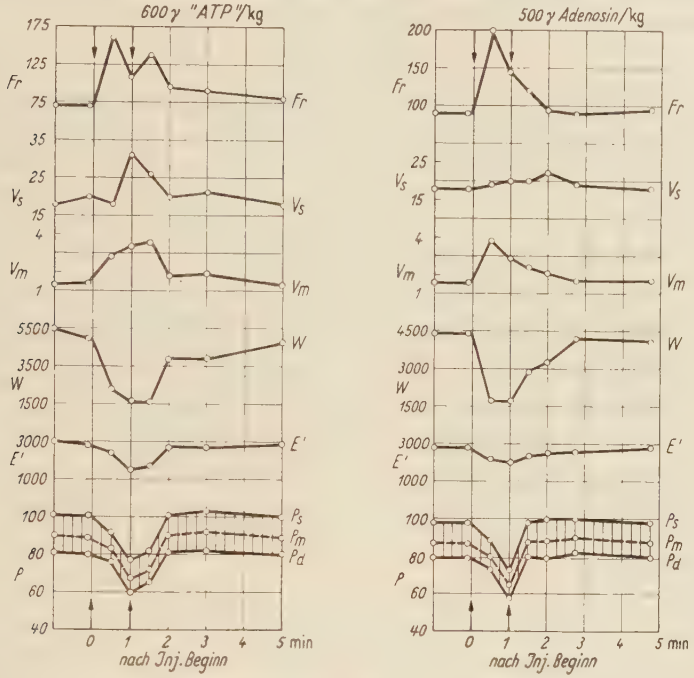


Abb. 3. Kreislaufanalysen nach WEZLER u. BÖGER. Hund Senta, 26 kg. Links: Injektion von 600 γ „ATP" I/kg (entsprechend 351 γ ATP + 90,6 γ ADP/kg); Rechts: Injektion von 500 γ Adenosin/kg. *Fr* Herzfrequenz/min; V_s Schlagvolumen [cm³]; V_m Minutenvolumen [*l*]; *W* peripherer Strömungswiderstand [dyn sec/cm⁵]; *E'* Elastizitätskoeffizient [dyn/cm⁵]; *P* Carotisdruck [mm Hg].

Tier, doch wurden hier zur Senkung des Mitteldrucks für alle 3 Stoffe 2—3mal höhere Dosen benötigt. Ein Verhältnis von etwa 1 : 1,3 : 2,5 scheint auch für die stärkeren Blutdrucksenkungen bei höherer Dosierung zu gelten, doch sind hier exakte Vergleiche schwierig[1].

Tabelle 1.

	Adenosin 10^{-2} μmol/kg	AMP 10^{-2} μmol/kg	„ATP" I[1] 10^{-2} μmol/kg
Atmungserregung	9,4—18,7	7,2—14,4	3,8—7,5
Tachykardie[2]	56	43	30
Blutdruckabfall[3]	56—75	43—58	23—30

[1] Die Zahlen beziehen sich bei „ATP" I auf die Summe der molaren Konzentrationen von ATP und ADP.

[2] Zunahme der Herzfrequenz um 30%.

[3] Blutdruckabfall um 10 mm Hg.

Nähere Erläuterungen im Text.

[1] Vergl. Anmerkung bei der Korrektur, S. 423.

Vergleichende Untersuchungen mit „ATP“ I und „ATP“ II ergaben keinen deutlichen Unterschied. Adenin, Ortho- und Pyrophosphat waren in Dosen bis zu 2 mg/kg wirkungslos. Die Adenosinwirkung wurde durch gleichzeitig injiziertes Pyrophosphat nicht verstärkt.

Diskussion.

Die Atmungs- und Kreislaufeffekte der Adenosinkörper unterscheiden sich beim wachen Hund wesentlich von denen an narkotisierten Tieren. So besteht nach Emmelin und Feldberg der typische *Atmungseffekt* hoher ATP-Dosen bei der narkotisierten Katze in einer Apnoe mit sekundärer Verstärkung der Atmung. Diese Wirkungen sollen zum Teil reflektorisch über den Lungenvagus, teilweise aber auch zentral ausgelöst werden. AMP war selbst bei dreifach höherer Dosierung unwirksam. In unseren Versuchen am wachen Hund kam es dagegen (in Übereinstimmungen mit den Beobachtungen von Hartmann; Matthes; Wayne u. Mitarb. sowie Davies u. Mitarb. am Menschen) nach Injektion von A, AMP und „ATP“ ausschließlich zu vertiefter und beschleunigter Atmung. Dieser Effekt stellte sogar die erste pharmakologische Wirkung der Adenosinkörper dar. Der prinzipielle Unterschied zwischen den Angaben von Emmelin und Feldberg und unseren Ergebnissen beruht neben Narkose und Dosierung vielleicht auch auf der Verwendung verschiedener Tierarten[1].

Es ist ungewiß, auf welchem Weg die beschriebene Atmungserregung zustande kommt. Auffallend war die vollständige Übereinstimmung mit der Atmungswirkung von Nicotin am wachen Hund (Wagenmann). Es wäre denkbar, daß auch die Adenosinkörper zur Erregung von Chemoreceptoren führen. Interessant ist die Angabe von Belenkij, nach der ATP das Glomus caroticum erregt und gegenüber Acetylcholin, Cyanid und Milchsäure sensibilisiert[1].

Der typische Effekt von ATP auf die *Herzfrequenz* besteht an narkotisierten Tieren in einer Bradykardie. Diese soll vor allem bei der Katze, aber auch beim Hund, neben zentralen Wirkungen durch Vagusreflexe bedingt sein (Bielschowsky u. Mitarb., Emmelin u. Feldberg, Wayne u. Mitarb.). A und AMP führen in Narkose ebenfalls zur Bradykardie. Es scheint jedoch, daß hier direkte Herzwirkungen wie Sinusbradykardie und Herzblock ursächlich im Vordergrund stehen (Drury u. Szent-Györgyi, Bennet u. Drury, Bielschowsky u. Mitarb.). Wir fanden dagegen am wachen Hund (wie schon Richards, Hartmann, sowie Davies u. Mitarb. bei therapeutischen Dosen am Menschen) nach „ATP“, AMP oder A ausschließlich *Beschleunigungen* der Herzfrequenz. Diese Tachykardie ist wohl als regulatorischer Ausgleich der peripheren Widerstandsverminderung aufzufassen, welcher durch die Narkose

[1] Vergl. Anmerkung bei der Korrektur, S. 423.

verhindert wird. Erst nach extrem hoher Dosierung von „ATP" kam es auch am nicht narkotisierten Hund zur Herzverlangsamung. (Vgl. Drury u. Szent-Györgyi, Honey u. Mitarb., Wayne u. Mitarb.) Bei etwas geringerer Dosierung trat lediglich ein vorübergehendes Nachlassen der Tachykardie auf. Diese „relative Bradykardie" stellt wohl das erste sichtbare Anzeichen einer mit der gegenregulatorischen Tachykardie konkurrierenden Herzwirkung dar. Ihr häufigeres Auftreten bei „ATP" könnte mit der stärkeren Vaguswirkung von ATP zusammenhängen. Da demnach die einzelnen Adenosinkörper je nach Dosierung die Herzfrequenz über verschiedene Angriffspunkte beeinflussen können, ist unsere Relation der herzbeschleunigenden Wirkungsstärken nur für den in Tab. 1 angegebenen niedrigen Dosierungsbereich gültig.

Direkte oder reflektorische Herzwirkungen der Adenosinkörper sollen auch zusammen mit der peripheren Gefäßerweiterung den *Blutdruckabfall* bedingen. Nach Emmelin und Feldberg ist außerdem die von Bennet und Drury erstmals beschriebene, von Gaddum und Holtz näher untersuchte Kontraktion der Lungengefäße von Bedeutung, indem sie das Minutenvolumen — durch verminderte Füllung des linken Ventrikels — reduziert. Der mit den Versuchsbedingungen wechselnde Einfluß dieser Faktoren dürfte die auseinandergehenden Angaben über die relative Blutdruckwirksamkeit von A, AMP und ATP zum Teil erklären. Sicher spielt auch die Verwendung nicht genau definierter Präparate eine Rolle. Weitgehende Übereinstimmung herrscht nur bezüglich der in einer Größenordnung liegenden depressorischen Wirkungsstärken von AMP und A. ATP soll dagegen bis zu siebenmal stärker depressorisch wirken können (Herbrand u. Jaeger). In unseren Versuchen verhielten sich A, AMP und „ATP", gemessen am Blutdruckabfall, etwa wie 1 : 1,3 : 2,5.

A, AMP und „ATP" führten beim wachen Hund in keinem Fall zu einer Abnahme, sondern — wohl als gegenregulatorischer Ausgleich des verminderten peripheren Strömungswiderstandes — regelmäßig zu einer Zunahme des Minutenvolumens. Diese erfolgte durch Vermehrung der Herzfrequenz bei vergrößertem oder verkleinertem Schlagvolumen. Hauptursache des Blutdruckabfalls dürfte daher in unseren Versuchen, nach der starken Verminderung des peripheren Gefäßwiderstandes zu urteilen, die Gefäßerweiterung sein. Minutenvolumen und Herzleistung blieben selbst während der „relativen Bradykardie" erhöht.

Der gleichzeitige Anstieg von Arteriolen-, Capillar- und Venendruck in der Extremität bedeutet nach Schroeder und Anschütz eine Eröffnung der nutritiven Gefäße. Die Zunahme der Extremitätendurchblutung war jedoch, z. B. im Vergleich zu unseren Versuchen mit Magnesiumsulfat, sehr gering. Von einer starken Erweiterung der Gefäße bei isolierter Durchströmung und intraarterieller Injektion (Bennet u. Drury, Marcou; Schoedel; Fleisch u. Mitarb., Folkow; Davies u. Mitarb.)

darf demnach nicht auf gleiche pharmakologische Wirkungen bei intravenöser Zufuhr geschlossen werden. Die deutliche Verminderung des peripheren Gesamtwiderstandes ist lediglich ein Hinweis darauf, daß andere Gefäßgebiete, wieder im Gegensatz zu Magnesiumsulfat, stärker dilatiert werden[1]. Bei höherer Dosierung kommt es durch die Blutdrucksenkung lediglich zur druckpassiven Abnahme der Durchblutung. Die Zweckmäßigkeit einer intravenösen Adenosinkörpertherapie bei peripheren Durchblutungsstörungen ist nach diesen Versuchen, in Übereinstimmung mit den wechselnden Ergebnissen von Davies u. Mitarb., wohl in Frage zu stellen. Unsere Erfahrungen an der in Eiswasser befindlichen Extremität sprechen ebenso wie jene bei elektrischer Reizung des Nierenhilus (Eichholtz, Taugner u. Braun) gegen die Erwartung wesentlich günstigerer spasmolytischer Effekte an kontrahierten Gefäßen. Die pharmakodynamische Wirkung von ATP darf auch im Hinblick darauf, daß ATP möglicherweise den Stoffwechsel anoxisch geschädigter Gewebe verbessert, nicht überschätzt werden. Da die gefäßerweiternde Wirkung von ATP an der Extremität im Vergleich zu A und AMP eher geringer ist, lassen sich aus unseren Versuchen außerdem keine Gründe für eine bevorzugte Verwendung von ATP ableiten.

Abgesehen von der Unbeständigkeit der ATP, ist es bekanntlich zur Zeit noch schwierig, sie in reiner Form zu gewinnen. Schmitz führte kürzlich den Nachweis, daß die handelsüblichen Präparate neben unterschiedlichen Mengen von ATP, ADP und AMP auch noch verschiedene andere Nucleotide enthalten. Diese stellen wahrscheinlich die in „ATP" I und II in einer Menge von 6,1 bzw 15,5% des Gesamt-P enthaltene „unbekannte Fraktion" dar. Die Tatsache, daß wir bei beiden Präparaten trotz deutlich verschiedenen Gehalts an „unbekannter Fraktion" dieselben Effekte in Abhängigkeit vom ATP- und ADP-Gehalt fanden, spricht dafür, daß derartige Beimengungen bei unseren Untersuchungen ohne wesentliche Bedeutung waren. Die pharmakologische Prüfung dieser gereinigten, auch im tierischen Gewebe vorkommenden Begleit-Nucleotide steht noch aus.

Zusammenfassung.

Am nichtnarkotisierten Hund wurden nach den Methoden von Schroeder vergleichende Untersuchungen über die Atmungs- und Kreislaufwirkung von Adenosin, Muskeladenylsäure und Adenosintriphosphorsäure angestellt.

Im Unterschied zu den Ergebnissen an narkotisierten Tieren fanden wir ausschließlich eine atmungserregende Wirkung der Adenosinkörper.

[1] Über die Durchblutung im Mesenterialgebiet vgl. Schretzenmayr; Marcou sowie Folkow, über die Nierendurchblutung Houck u. Mitarb.

Der bekannte Blutdruckabfall war — im Gegensatz zur Bradykardie beim Tier in Narkose — von einer Tachykardie begleitet. Der Blutdruckabfall scheint den Kreislaufanalysen nach Wezler und Böger zufolge vor allem durch periphere Gefäßerweiterung zustande zu kommen. Die Extremitätendurchblutung war jedoch nur geringgradig vermehrt.

Die molaren Wirkungsstärken von Adenosin, AMP und (ATP + ADP) verhielten sich an Atmung und Kreislauf etwa wie 1 : 1,3 : 2,5.

Die Befunde werden mit den Ergebnissen früherer Arbeiten verglichen und in ihrer möglichen therapeutischen Bedeutung diskutiert.

Anmerkung bei der Korrektur. Gemeinsam mit H.-G. Straub prüften wir die Atmungs- und Kreislaufwirkungen von A, AMP und „ATP" I auch an 22 *Katzen* in Urethan-Chloralose-Narkose (250 bzw. 60 mg/kg). Wegen der ausgeprägten Tachyphylaxie wurden die Adenosinkörper in verschiedener Reihenfolge i.v. injiziert.

Der erste Effekt kleinster Dosen (20—300 γ A bzw. 10—50 γ „ATP"/kg) bestand auch hier regelmäßig in einer *Atmungserregung*, meist einem „tiefen Atemzug". Das Verhältnis der molaren Wirkungsstärken lag dabei zwischen 1 : 5 und 1 : 20. AMP war nicht wesentlich stärker als A. Bei höherer Dosierung trat die von Emmelin u. Feldberg beschriebene Atemlähmung, jedoch nicht nur nach „ATP", sondern auch nach etwa 15mal größeren Dosen von AMP und A auf.

An vagotomierten Tieren wurde die Atmung bei i.v. Injektion meist erst durch 0,2—1,0 mg „ATP" bzw. 1—4 mg A oder AMP/kg verstärkt. Die Reaktion war auch insofern verändert, als der für intakte Tiere charakteristische „tiefe Atemzug" nach Vagotomie ausblieb; er scheint bei i.v. Injektion am intakten Tier durch Erregung besonders empfindlicher Chemoreceptoren, vielleicht in der Lunge, zu entstehen. Die geringere Atmungssteigerung des vagotomierten Tieres erfolgt dagegen wahrscheinlich über die Chemoreceptoren des Carotissinus: Bei Injektion in die A. thyreoidea führten 20—50 γ „ATP" bzw. 50—200 γ A nur am nicht-denervierten Sinus regelmäßig zur Atmungssteigerung. Bei höherer Dosierung traten — auch nach Denervierung des Sinus — häufiger zentrale Verminderungen der Atmung auf. Diese Befunde bestätigen die Ansicht von Belenkij, wonach „ATP" die Chemoreceptoren des Sinus erregt bzw. sensibilisiert; die — wenn auch geringere — Wirksamkeit von A spricht jedoch nicht dafür, daß „ATP" dabei am Zellstoffwechsel angreift.

Ähnlich wie die Atmungswirkung waren auch die *Kreislaufeffekte* von „ATP" an der narkotisierten Katze im Vergleich zu denen von A und AMP wesentlich stärker als beim wachen Hund: Verminderungen des arteriellen Mitteldrucks um 30—40 mm Hg wurden durch 0,2—0,5 mg „ATP"/kg, dagegen erst durch 13 bzw. 7mal größere molare Dosen von A und AMP erzielt. Stärkere Drucksenkungen mit deutlicher vago-reflektorischer Komponente (Bradykardie, unter Umständen kurzdauernde Atemlähmung) entstanden im Vergleich zu „ATP" sogar erst nach 30- bzw. 18mal höheren molaren Mengen von A und AMP. Die Ermittlung äquidepressorischer Dosen von Adenosinkörpern kann demnach sogar am gleichen Tiermaterial zu verschiedenen Relationen führen, wenn, je nach dem Dosenbereich, verschiedene Mechanismen an der Blutdrucksenkung beteiligt sind.

Literatur.

Anschütz, H. F. u. W. Schroeder: Die Wirkung verschiedener pharmakologischer Substanzen auf die Durchblutung der Capillaren b. w. der arteriovenösen Anastomosen in der Extremität des Hundes. Z. exper. Med. **116**, 291 (1950). — Belenkij, M. L.: Über den Einfluß der Adenosintriphosphorsäure auf die chemische Empfindlichkeit des Carotissinusknotens. Dokl. Akad. Nauk. SSSR, N. S. **76**, 305 (1951). — Bennet, D. W., and A. N. Drury: Further observations relating to the physiological activity of adenine compounds. J. of Physiol. **72**, 288 (1931). — Bielschowsky, M., H. N. Green and H. B. Stoner: The effect of magnesium and calcium on the physiological properties of certain purine derivatives. J. of Physiol. **104**, 239 (1946). — Davies, D. F., A. L. Gropper and H. A. Schroeder: Circulatory and respiratory effects of adenosine triphosphate in man. Circulation (New York) **3**, 543 (1951). — Drury, A. N., and A. Czent-Györgyi: The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. J. of Physiol. **68**, 213 (1929). — Eichholtz, F., R. Taugner u. W. Braun: Untersuchungen zur Behandlung renaler Ischämien. Arch. internat. Pharmacodynamie **98**, 118 (1954). — Emmelin, N., and W. Feldberg: Systemic effects of adenosine triphosphate. Brit J. Pharmacol. **3**, 273 (1948). — Fleisch, A., u. P. Weger: Die gefäßerweiternde Wirkung der phosphorylierten Stoffwechselprodukte. Pflügers Arch. **239**, 362 (1938). — Fleisch, A., u. R. Domenjoz: Die gefäßerweiternde Wirkung von Adenylsäure und Adenosintriphosphorsäure. Klin. Wschr. **1940**, 984. — Folkow, B.: The vasodilator action of adenosine triphosphate. Acta physiol. scand. (Stockh.) **17**, 311 (1949). — Gaddum, J. H., and P. Holtz: The localisation of the action of drugs on the pulmonary vessels of dogs and cats. J. of Physiol. **77**, 139 (1933). — Gerlach, E., u. E. Weber: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. (im Druck). — Hartmann, W.: Die Wirkung von Adenosinphosphorsäure im Elektrokardiogramm. Z. klin. Med. **121**, 424 (1932). — Herbrand, W., u. K. H. Jaeger: Das Adenylsäuresystem. Aulendorf i. Württ.: Editio Cantor K.G. 1952. — Honey, R. M., W. T. Ritchie and W. A. R. Thomson: The action of adenosine upon the human heart. Quart. J. Med. **23**, 485 (1930). – Zit. n. W. Hartmann, Z. klin. Med. **121**, 424 (1932). — Houck, C. R., R. J. Bing, F. N. Craig and F. E. Visscher: Renal hyperemia after the intravenous infusion of adenylic acid, adenosine, or adenosine-triphosphate in the dog. Amer. J. Physiol. **153**, 159 (1948). — Marcou, I.: Sur l'adénosine et son action hypotensive. Comp. Rend. Soc. Biol. **109**, 788 (1932). — Sur l'action vasculaire élective de l'adenosine. C. r. Soc. Biol. (Paris) **109**, 985 (1932). — Matthes, K.: Untersuchungen über das Wirkungsbild gefäßaktiver Pharmaka beim Menschen. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **203**, 194 (1944). — Richards, F. A.: The effect of adenylic acid and adenosine on the human heart and blood vessels. J. of Physiol. **81**, 10 (1934). – Schmitz, H.: Zur Reinheit handelsüblicher Adenosin-5′-triphosphat-Präparate. Angew. Chem. **66**, 327 (1954). — Schoedel, W.: Die Wirkung der Muskel-Adenylsäure und chemisch verwandter Stoffe auf die Durchblutung des Skeletmuskels. Pflügers Arch. **236**, 93 (1935). — Schretzenmayr, A.: Über die regulatorische Bedeutung der großen Arterien. II. Teil. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **176**, 160 (1934). — Schroeder, W.: Methodik der fortlaufenden Kreislaufanalyse am Hunde. Arch. Kreislaufforsch. **15**, 24 (1949). — Methodik der fortlaufenden Messung des Venen-, Capillar- oder Arteriolendruckes in der vorderen Extremität des wachen Hundes. Z. Biol. **103**, 389 (1950). — Ein einfaches Gerät zur Verstärkung des arteriellen Pulsdruckes und zur fortlaufenden optischen Registrierung der Pulswellengeschwindigkeit. Z. exper. Med. **117**, 181 (1951). — Schroeder, W., u. H. F. Anschütz: Die Wirkung von Acetylcholin, Adrenalin und Histamin auf die Durchblutung der Capillaren und arteriovenösen Anastomosen

in der vorderen Extremität des Hundes. Z. Biol. **103**, 395 (1950). — Wagenmann, U.: Über die Atmungs- und Kreislaufwirkung von Magnesiumsulfat, Adenosinkörpern und Nicotin beim nicht narkotisierten Hund. Dissertation Heidelberg, 1954. — Wayne, E. J., J. F. Goodwin and H. B. Stoner: The effect of adenosine triphosphate on the electrocardiogram of man and animals. Brit. Heart. J. **11**, 55 (1949). — Wezler, K., u. A. Böger: Die Dynamik des arteriellen Systems. Ergebn. Physiol. **41**, 292 (1939). — Wezler, K., u. R. Thauer: Unblutige Druckregistrierung am Tier mittels der Carotisschlinge. Z. exper. Med. **108**, 377 (1941). — Unblutige Schlag- und Minutenvolumbestimmung am Hund ohne Narkose. Z. Kreislaufforsch. **33**, 486 (1941).

cand. med. U. Wagenmann, Pharmakol. Institut d. Universität Heidelberg.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 224, S. 426—433 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. F. Eichholtz).

Zur Kreislaufwirkung der Magnesiumsalze*.

Von
E. Schmid, M. v. Bubnoff, U. Wagenmann und R. Taugner.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 12. Oktober 1954.)

Wezler hat wiederholt auf die besonderen Kreislaufreaktionen narkotisierter Tiere hingewiesen. Die Schroederschen Methoden erlauben nun erstmalig die Ausführung fortlaufender Kreislaufuntersuchungen am wachen Hund. Es scheint notwendig, damit die Kreislaufwirkung einzelner Pharmaka ohne die modifizierenden Einflüsse der Narkose erneut zu studieren. Dies wurde hier für die Magnesiumsalze versucht.

Entsprechend der zusammenfassenden Darstellung von Engbaek sind auch die näheren Angriffspunkte von Mg^{++} am Kreislaufsystem nicht ausreichend bekannt. An narkotisierten Tieren führt Mg^{++} regelmäßig zu der bekannten Blutdrucksenkung. Diese beruht auf einer Gefäßerweiterung, die durch direkten Angriff an der glatten Muskulatur, durch Lähmung sympathischer Ganglien (Stanbury), vielleicht auch zentral ausgelöst werden kann. Auch die verminderte Förderleistung des Herzens soll an der Blutdrucksenkung beteiligt sein (Gotsev; Stanbury u. Farah). Die Bedeutung der einzelnen Faktoren ist nicht sicher bekannt, ebensowenig der Anteil verschiedener Stromgebiete an der Vasodilatation. Wir führten daher ergänzende Versuche über die Reaktion einzelner Gefäßgebiete sowie die Mg-Empfindlichkeit sympathischer Ganglien an narkotisierten Katzen aus.

Versuchsanordnung. An nichtnarkotisierten Carotisschlingenhunden wurden Blutdruck, Arteriolen-, Capillar- oder Venendruck der Vorderpfote nach Schroeder (a, b) sowie die Atmung mit Thoraxmanschette registriert. Kreislaufanalysen nach Wezler und Böger erfolgten in der von Schroeder (c) angegebenen Modifikation der Wezler-Thauerschen Anordnung. Als Versuchstiere dienten zwei Hündinnen: Senta, Schäfer-Bastard, 26 kg, und Hella, Dobermann, 22 kg.

Magnesiumsulfat ($MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$) wurde in einem Volumen von 1—4 cm^3 in $^1/_4$—$1^1/_2$ min i.v. injiziert. Innerhalb von drei Monaten erhielten die Tiere im Mindestabstand von 5—6 Std etwa 40 Injektionen von 5—60 mg $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$/kg. In einigen Versuchen wurde anstatt Sulfat Mg-Ascorbat[1] verwendet.

---

* Herrn Prof. Dr. F. Eichholtz zum 65. Geburtstag gewidmet.

[1] Der Firma E. Merck-Darmstadt sind wir für die Überlassung der 10%igen Mg-Ascorbatlösung (Magnorbin) zu Dank verpflichtet.

An Katzen in Urethan-Chloralose-Narkose (250 bzw. 60 mg/kg) wurde die Durchblutung einzelner Gefäßgebiete mit dem bubble-flow-meter nach Braun, Althoff u. Taugner registriert. Zur Verhütung der Blutgerinnung diente Thrombocid[1] (40 mg/kg i.v.). $MgSO_4$ wurde hier in 10%iger Lösung in 2 min injiziert. In einer weiteren Versuchsserie verwendeten wir zur Prüfung der ganglioplegischen bzw. sympathicolytischen Wirkung von $MgSO_4$ Katzen, welche nach Barger u. Dale dekapitiert waren.

Versuchsergebnisse.

Beim *narkotisierten* Hund besteht die typische Reaktion auf Magnesiumsulfat in Blutdrucksenkung und Bradykardie, welche bei steigender Dosierung zunehmen (Matthews u. Jackson, Rothberger u. Zwillinger, Haury, Stanbury). Nach Hoff, Smith u. Winkler hängen beide vom Mg-Spiegel im Blutserum ab. Im Gegensatz dazu kam es in unseren Versuchen am *wachen* Hund in gewissen Dosenbereichen (Senta

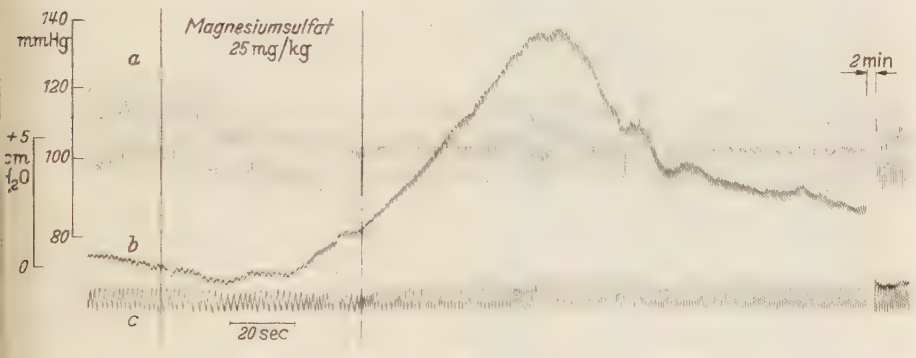


Abb. 1. Hund Senta, 26 kg, *a*) Blutdruck, *b*) Capillardruck, *c*) Atmung. Zwischen den Lichtmarken Injektion von 25 mg $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$/kg.

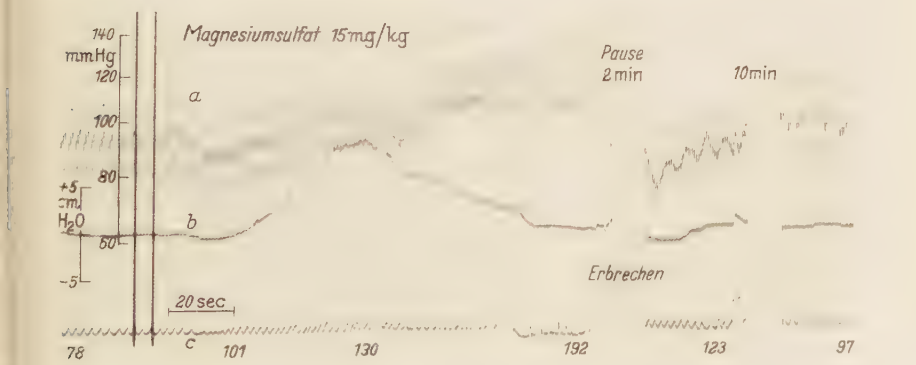


Abb. 2. Hund Senta, 26 kg. *a*) Blutdruck, *b*) Arteriolendruck, *c*) Atmung. Zahlen unter Atemregistrierung: Herzfrequenz/min. Zwischen den Lichtmarken Injektion von 15 mg $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$/kg.

[1] Der Firma Dr. W. Benend (München-Solln) danken wir für die Überlassung des Präparates.

15—23, Hella 15—60 mg/kg) nur zu einem geringgradigen Abfall des Mitteldrucks um höchstens 5 bzw. 10—20 mm Hg bei gleichzeitiger Tachykardie (Abb. 1 u. 3). Ausmaß und Dauer dieser Tachykardie waren dosisabhängig. Ein stärkerer Blutdruckabfall war bei weiterer Erhöhung der Dosen jedoch überraschenderweise nicht zu erzielen: Es kam sogar bei Überschreitung einer bestimmten Schwelle (Senta 25 mg $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$/kg) zum Blutdruckanstieg mit extremer Tachykardie (Abb. 2). Bei derartigen Dosen trat meist Erbrechen auf.

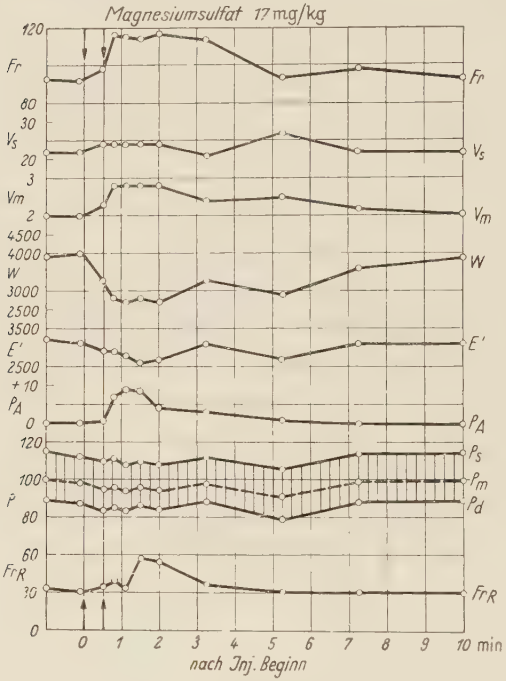


Abb. 3. Hund Senta, 26 kg. Kreislaufanalyse nach Wezler u. Böger. Injektion von 17 mg $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$/kg. *Fr* Herzfrequenz/min; V_s Schlagvolumen [cm³]; V_m Minutenvolumen [l]; *W* peripherer Strömungswiderstand [dyn · sec/cm⁵]; *E'* Elastizitätskoeffizient [dyn/cm³]; P_A Arteriolendruck [cm H_2O]; *P* Carotisdruck [mm Hg]; Fr_R Atemfreqenz/min.

Die Tachykardie stellte sich bei Bestimmung der physikalischen Kreislaufgrößen nach Wezler u. Böger als wesentlichste Komponente einer Erhöhung des Minutenvolums durch Magnesiumsulfat dar (11 Analysen, vgl. Abb. 3). Das Minutenvolumen stieg bei Dosen von 15—25 bzw. 35—60 mg/kg meist um 50—60, unter Umständen um 100% an. Das Schlagvolumen war (bei geringerer Zunahme der Herzfrequenz) in zwei Versuchen vergrößert, sonst (bei stärkerer Tachykardie) vermindert. Mit der Zunahme des Minutenvolumens lief als typische Reaktion eine Senkung des gesamten peripheren Gefäßwiderstandes um etwa 30—40% einher. In einigen Fällen reagierte der periphere Widerstand zwei- bzw. dreiphasisch, indem er vorübergehend, unter Umtsänden sogar über den Ausgangswert hinaus, anstieg. Die Ruhewerte aller Größen stellten sich je nach Dosierung innerhalb von 5—15 min wieder ein. Mg-Ascorbat wirkte in äquivalenter Dosierung wie Mg-Sulfat.

Die Atmung war nach der Injektion von Magnesiumsulfat vorübergehend verkleinert. Bei höheren Dosen (Senta ab 20 mg/kg) trat anschließend eine Beschleunigung und Vertiefung der Atmung bis zum Hecheln auf (Abb. 1 u. 2). Bei Hella waren diese Veränderungen weniger

ausgeprägt, Hecheln wurde z. B. erst nach 55 mg/kg beobachtet. Als weitere Nebenwirkungen sahen wir Aufhören von Kältezittern, Schlecken, Speichelfluß, Würgen und schließlich Erbrechen.

Die Registrierung von Arteriolen-, Capillar- bzw. Venendruck der vorderen Extremität nach SCHROEDER sollte qualitative Aufschlüsse über die Reaktion eines Gefäßgebietes als Teilwiderstand geben. Wir fanden einen von der Magnesiumsulfat-Dosis abhängigen Druckanstieg in allen drei Gefäßabschnitten (Abb. 1 u. 2). Der Arteriolendruck nahm — bei gleichzeitiger Vergrößerung der Einzelpulse — maximal um 12 cm H_2O zu. Senta reagierte auch hier doppelt so empfindlich wie Hella (Schwellendosen 10 bzw. 25 mg/kg).

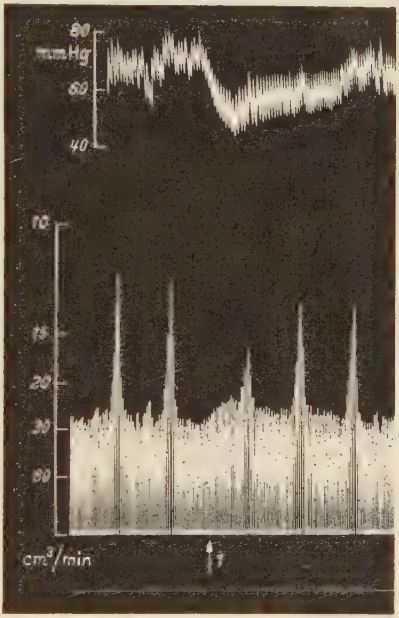


Abb. 4. Katze, 2,4 kg, in Urethan-Chloralose-Narkose. Oben: Blutdruck; unten: Nierendurchfluß. Bei 1: i.v. Injektion von 50 mg $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$/kg in 2 min. Zwischen den einzelnen Reizperioden von je 30 sec war das Kymographion abgestellt.

Zur quantitativen Bestimmung der Extremitätenmehrdurchblutung registrierten wir den venösen Ausfluß der hinteren Extremität (V. femoralis oberhalb der V. saphena) an 5 narkotisierten Katzen. 10—75 mg Magnesiumsulfat/kg bewirkten bei 14 von 21 Injektionen eine Mehrdurchblutung um 10 bis 100%. Eine starke Vermehrung trat in einem Versuch schon bei 15 mg/kg auf, meist lag die optimale Dosierung jedoch bei 50 mg/kg. Bei weiteren 5 Tieren wurde zur Ausschaltung von Hautgefäßen die V. saphena unterbunden. Die Ergebnisse änderten sich dadurch nicht wesentlich.

Die Darmdurchblutung wurde aus der V. mesenterica superior gemessen. 8 von 13 Magnesiumsulfatinjektionen (15—50 mg/kg, 5 Tiere) führten hier zu einer Mehrdurchblutung von 5—20%. Der Nierendurchfluß war nach denselben Dosen an 3 Katzen nicht verbessert. Zur Erhöhung des Gefäßtonus in Darm und Niere wurden die periarteriellen sympathischen Nervenplexus von A. mesenterica sup. bzw. A. renalis mit chlorierten Silberelektroden elektrisch gereizt. Reizstärke, -dauer und -frequenz betrugen 5—15 mA, 10 msec bzw. 40/sec. An der A. mesenterica verwendeten wir Dauerreize, am Nierenhilus Reizperioden von je 30 sec in Abständen von 5 min. Die Spasmen der Darmgefäße wurden

durch Magnesiumsulfat in 6 von 7 Fällen vermindert, 2mal sogar aufgehoben. Die Ischämie der Niere konnte durch 15—50 mg/kg entsprechend Abb. 4 in 10 von 12 Fällen auf die Hälfte reduziert werden.

Die Reizung der Nickhaut erfolgte prä- und postganglionär mit Dauerreizen von je 10 min. Die Reizqualitäten betrugen $^1/_4$—1 mA, 10 msec, 3/sec. Im Gegensatz zu den Angaben von Stanbury bei Injektion in die A. lingualis führte die intravenöse Zufuhr in unseren Versuchen nicht nur bei präganglionärer, sondern auch bei postganglionärer Reizung zur vorübergehenden, wenn auch etwas geringeren Erschlaffung der Nickhaut (50 bzw. 35%). Für derartige Effekte wurden 150 mg $MgSO_4 \cdot 7H_2O$/kg benötigt. Die Schwellendosen lagen bei 50 mg/kg.

Diskussion der Versuchsergebnisse.

Im Gegensatz zu den Verhältnissen an narkotisierten Tieren (dosisabhängiger Blutdruckabfall und Bradykardie) fanden wir am wachen Hund nach Injektion von Magnesiumsulfat nur einen unbedeutenden Blutdruckabfall mit Tachykardie. Diese Reaktion ist, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Mechelke und Nusser am Menschen offenbar typisch für den nicht unter Narkoseeinflüssen stehenden Kreislauf. Auch Smith, Winkler u. Hoff fanden am wachen Hund bei relativ geringer Erhöhung des Magnesiumspiegels kurzdauernde Tachykardien, die bei fortdauernder Infusion in Bradykardie übergingen. In unseren Versuchen kam es dagegen auch nach Zufuhr höherer, brechenerregender $MgSO_4$-Dosen lediglich zu verstärkter Trachykardie, unter Umständen begleitet von einem bisher unbekannten Blutdruckanstieg.

Mit der Tachykardie war meist eine leichte Abnahme des Schlagvolumens verknüpft; dagegen war das Minutenvolumen bei praktisch konstantem Mitteldruck und Verminderung des peripheren Widerstands in allen Kreislaufanalysen deutlich erhöht. Die Herzleistung war in unseren Versuchen somit nicht vermindert, wie dies bei hohen Magnesium-Dosen am Herz-Lungen-Präparat von Stanbury und Farah gefunden wurde und möglicherweise auf der negativ dromotropen Wirkung von Mg^{++} beruht (Miki; Rothberger u. Zwillinger, Smith, Hoff u. Winkler).

Die Ursachen der grundsätzlichen Unterschiede in der Wirkung von Magnesiumsulfat am wachen und narkotisierten Tier können nur vermutet werden. Bei narkotisierten Tieren trifft Magnesiumsulfat auf einen zentralisierten Kreislauf mit erhöhtem peripherem Widerstand (Thauer u. Wezler; Duesberg u. Schroeder). Die gefäßerweiternde Wirkung des Magnesiums dürfte sich — auch nach unseren Versuchen mit elektrischer Reizung des Nierenhilus — unter diesen Umständen stärker auswirken. Es scheint außerdem, daß Tachykardie und vermehrtes

Minutenvolumen beim wachen Tier zur Aufrechterhaltung des arteriellen Drucks trotz peripherer Gefäßerweiterung dienen, die Narkose jedoch durch Ausschaltung dieser Gegenregulationen die direkten Wirkungen von Magnesium auf Herz und Gefäße aufdeckt. Die Blutdrucksteigerung nach hohen Dosen kann auf diese Weise jedoch nicht erklärt werden. Sie ist auch nicht durch das Erbrechen bedingt, da der bei Nausea zu beobachtende Blutdruckanstieg mit Tachykardie viel geringer und nur von kurzer Dauer ist (Brooks u. Luckhardt). Es sei daran erinnert, daß Stanbury bei intracarotidealer Injektion von Magnesiumchlorid zentrale Blutdrucksteigerungen fand. Tatsächlich besitzt ja Mg^{++} neben zentral lähmenden auch erregende Eigenschaften, vor allem auf vegetative Zentren. Welchen Anteil diese Komponenten sowie die von Heymans beschriebene Verminderung der Pressoreceptorenaktivität an den Kreislaufreaktionen des wachen Tieres nach Magnesiumsalzen nehmen, bleibt ungewiß.

Die Schroedersche Anordnung erlaubt, die an sich bekannte Erweiterung der Extremitätengefäße durch Magnesiumsalze näher zu analysieren. Das gleichzeitige Ansteigen von Arteriolen-, Capillar- und Venendruck spricht für eine Erweiterung der nutritiven Gefäße ohne Beteiligung arteriovenöser Kurzschlüsse (vgl. Schroeder und Anschütz). Die Methode gestattet jedoch keine Aussagen darüber, ob neben der Hautdurchblutung (Hoff, Smith u. Winkler; Heagy u. Burton; Mechelke u. Nüsser) auch die Muskeldurchblutung auf Magnesiumsalze reagiert. Nach unseren Versuchen an narkotisierten Katzen scheinen beide Gefäßgebiete etwa in gleichem Ausmaß anzusprechen. Die im Vergleich zu der starken Mehrdurchblutung der Extremität relativ schwache Senkung des peripheren Widerstands ließ eine geringere Mg-Empfindlichkeit anderer Gefäßgebiete erwarten. Tatsächlich fanden wir an der narkotisierten Katze ohne elektrische Reizung der sympathischen Nervengeflechte im Darm nur geringe, in der Niere keine Mehrdurchblutung. Diese Ergebnisse stehen nicht ganz im Einklang mit denen von Haury, welcher an Hunden eine stärkere Magnesiumwirkung auf die Gefäße der Niere, eine schwächere auf die des Darms fand (vgl. auch Hazard u. Wurmser, Gotsev). Nach Stanbury kommt die Gefäßerweiterung hauptsächlich über die Lähmung sympathischer Ganglien zustande. Unsere Ergebnisse bei elektrischer Reizung des Halssympathicus sprechen jedoch dafür, daß auch der periphere Angriffspunkt von Magnesiumsulfat an der glatten Muskulatur eine Rolle spielt. Im gleichen Sinne sprechen unsere Ergebnisse bei postganglionärer Reizung des Plexus renalis.

Die atemlähmende Wirkung hoher Magnesiumdosen ist seit Meltzer und Auer bekannt. Dagegen ist unseres Wissens eine vorübergehende, schwache Atemhemmung nach rascher Injektion kleiner Dosen (5 bis

10 mg/kg) noch nicht beschrieben. Es handelt sich dabei mit Sicherheit nicht um „curareartige" Effekte. Sekundäre Tachypnoe und Hecheln sind wohl als Ausdruck der von Heagy und Burton beschriebenen Wirkung von Magnesium auf die Wärmeregulation zu deuten.

Zusammenfassung.

An wachen Carotisschlingenhunden wurde die Kreislaufwirkung von Magnesiumsulfat mit den Schroederschen Methoden untersucht.

Im Gegensatz zu den Verhältnissen am narkotisierten Tier (Blutdrucksenkung und Bradykardie) fanden wir am wachen Hund eine dosisabhängige Tachykardie mit nur geringgradigem Blutdruckabfall. Höhere, meist erbrechenerregende Dosen (25 bzw. 60 mg $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$/kg) führten sogar zum Blutdruckanstieg.

Die Extremitätendurchblutung wurde durch Magnesiumsulfat deutlich vermehrt. Die hierzu benötigten Mengen betrugen etwa 10—20% der narkotischen Dosis.

Die Ursachen der verschiedenen Magnesiumwirkung an wachen und narkotisierten Tieren werden erörtert.

Literatur.

Barger, G., and H. H. Dale: Chemical structure and sympathomimetic action of amines. J. of Physiol. **41**, 19 (1910). — Braun, W., K. H. Althoff u. R. Taugner: Bubble flow meter mit automatischer Registrierung. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 529 (1954). — Brooks, C., and A. B. Luckhardt: The blood pressure during vomiting. Amer. J. Physiol. **36**, 104 (1915). — Duesberg, R., u. W. Schroeder: Pathophysiologie und Klinik der Kollapszustände. Leipzig: S. Hirzel 1944, S. 53. — Engbaek, L.: The pharmacological actions of magnesium ions with particular reference to the neuromuscular and the cardiovascular system. Pharmacol. Rev. **4**, 396 (1952). — Gotsev, T.: Blutdruck und Herztätigkeit. I. Kreislaufwirkung von Magnesium. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **201**, 322 (1943). — Haury, V. G.: The effect of intravenous injections of magnesium sulfate on the vascular system. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **65**, 453 (1939). — Hazard, R., et L. Wurmser: Action des sels de magnésium sur les vasoconstricteurs rénaux. C. r. Soc. Biol. (Paris) **110**, 525 (1932). — Heagy, F. C., and A. C. Burton: Effect of intravenous injection of magnesium chloride on the body temperature of the unanaesthetized dog, with some observations on magnesium levels and body temperature in man. Amer. J. Physiol. **152**, 407 (1948). — Heymans, C., et L. Capet: Influences du magnésium et du calcium sur la régulation proprioceptive de la pression artérielle. Arch. internat. Pharmacodynamie **71**, 164 (1945). — Hoff, H. E., P. K. Smith and A. W. Winkler: The relation of blood pressure and concentration in serum of potassium, calcium, and magnesium. Amer. J. Physiol. **127**, 722 (1939). — Matthews, S. A., and D. E. Jackson: The action of magnesium sulphate upon the heart and the antagonistic action of some other drugs. Amer. J. Physiol. **19**, 5 (1907). — Mechelke, K., u. E. Nusser: Über die Kreislaufwirkung von TEAB, Pendiomid und des Magnesiumsulfates bei normalen Menschen. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **214**, 1 (1951). — Meltzer, S. J., and J. Auer: Physiological and pharmacological studies of magnesium salts. II. The toxicity of intravenous injections; in particular the effects upon the centres of the medulla oblongata. Amer. J. Physiol. **15**, 387 (1906). — Miki, Y.: Experimentelle und

klinische Untersuchungen über die Dauer des Kammer-EKG. Z. exper. Med. **27**, 323 (1922). — Rothberger, C. J., u. L. Zwillinger: Über die Wirkung von Magnesium auf die Strophanthin- und die Bariumtachykardie. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **181**, 301 (1936). — Schroeder, W.: (a) Methodik der fortlaufenden Kreislaufanalyse am Hunde. Arch. Kreislaufforsch. **15**, 24 (1949). (b) Methodik der fortlaufenden Messung des Venen-, Capillar- oder Arteriolendruckes in der vorderen Extremität des wachen Hundes. Z. Biol. **103**, 389 (1950). — (c) Ein einfaches Gerät zur Verstärkung des arteriellen Pulsdruckes und zur fortlaufenden optischen Registrierung der Pulswellengeschwindigkeit. Z. exper. Med. **117**, 181 (1951). — Schroeder, W., u. H. F. Anschütz: Die Wirkung von Acetylcholin, Adrenalin und Histamin auf die Durchblutung der Capillaren und arteriovenösen Anastomosen in der vorderen Extremität des Hundes. Z. Biol. **103**, 395 (1950). — Smith, P. K., A. W. Winkler and H. E. Hoff: Electrocardiographic changes and concentration of magnesium in serum following intravenous injection of magnesium salts. Amer. J. Physiol. **126**, 720 (1939). — Stanbury, J. B.: The blocking action of magnesium ion on sympathetic ganglia. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **93**, 52 (1948). — Stanbury, J. B., and A. Farah: Effects of the magnesium ion on the heart and on its response to digoxin. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **100**, 445 (1950). — Thauer, R., u. K. Wezler: Die Kreislaufwirkung der gebräuchlichsten tierexperimentellen Narkotica. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **200**, 84 (1942). — Wezler, K., u. A. Böger: Die Dynamik des arteriellen Systems. Ergebn. Physiol. **41**, 292 (1939). — Wezler, K., u. R. Thauer: Unblutige Druckregistrierung am Tier mittels der Carotisschlinge. Z. exper. Med. **108**, 377 (1941). — Unblutige Schlag- und Minutenvolumbestimmung am Hund ohne Narkose. Z. Kreislaufforsch. **33**, 486 (1941).

Dr. med. E. Schmid, Pharmakolog. Institut d. Universität Heidelberg.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 224, S. 434—442 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. F. Eichholtz).

Zur Wechselwirkung von Kohlensäure und Krampfgiften*.

Von
D. Langnickel, D. Lüders, E. Schmid und R. Taugner.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 12. Oktober 1954.)

Die vorliegenden Untersuchungen gingen aus von der wiederholt diskutierten Frage, ob und in welchem Sinn Kohlensäure die Wirkung von Krampfgiften beeinflußt. Einige Untersucher wie Wieland u. Mayer, Gellhorn u. Heymans fanden eine Steigerung, andere eine Abschwächung der Krampferregbarkeit durch CO_2 (Ryan u. Guthrie, Gellhorn u. Yesinick, Moussatché, Pollock). Hendley, Davenport u. Toman lehnen wesentliche Einflüsse der Kohlensäure ab. Diese widerspruchsvollen Ergebnisse wurden, abgesehen von Variationen in Methodik und Tiermaterial, mit verschiedenen Krampfgiften und CO_2-Konzentrationen erzielt. Es scheint daher zweifelhaft, ob sich die eingangs gestellte Frage, wie verschiedentlich vermutet, für alle Krampfgifte einheitlich beantworten läßt.

Eine weitere Aufklärung dieses Problems versprachen wir uns aus systematischen Untersuchungen der Wechselwirkung von verschiedenen Krampfgiften und CO_2-Konzentrationen an narkotisierten Katzen. Zur Vermeidung von Narkoseeinflüssen wurden ähnliche Versuche auch an wachen Ratten durchgeführt.

Versuchsanordnung. An 54 Katzen wurden die Bewegungen beider hinteren oder einer vorderen und einer hinteren Extremität über modifizierte Keith-Lucas-Hebel registriert. 5 Tiere waren in Äthernarkose nach Barger u. Dale dekapitiert, die restlichen mit 65 mg Chloralose/kg narkotisiert. Das Rückenmark wurde bei 17 Katzen akut oder 24 Std vor Versuchsbeginn zwischen Th VII und XI durchtrennt. Bei weiteren 8 Tieren führten wir 5—9 Tage vor dem Versuch eine halbseitige Rückenmarksdurchtrennung nach Cannon und Haimovici durch. Bei 6 Katzen resezierten wir nach Luco und Eyzaguirre die Hinterwurzeln von L V bis S II, und zwar li. proximal, re. distal von den Spinalganglien. In diesen Versuchen registrierten wir beiderseits die Kontraktionen des M. fibularis longus. Die Tiere wurden in sämtlichen Versuchen künstlich beatmet, die CO_2-O_2-Gemische im allgemeinen für 5—10 min aus Atemsäcken zugeführt. Die Blutdruckregistrierung erfolgte über Hg-Manometer, wobei Thrombozid[1] zur Gerinnungsverhütung diente; injiziert wurde in die V. jugularis.

* Herrn Prof. Dr. F. Eichholtz zum 65. Geburtstag gewidmet.

[1] Der Firma Dr. W. Benend, München-Solln, danken wir für die freundliche Überlassung des Präparates.

Inzuchtratten von 150—250 g erhielten Strychnin und Brucin intraperitoneal, die anderen Krampfgifte subcutan. 15, bei den Nicotinversuchen 1 min später, wurden sie in einem luftdichten Glasbehälter 10 min lang der durchströmenden O_2-CO_2-Mischung ausgesetzt. In jeder Versuchsreihe verwendeten wir Tiere gleichen Geschlechts und Alters.

Versuchsergebnisse.

Da die *Kohlensäure allein* bekanntlich krampfartige Erscheinungen hervorrufen kann, wurden zunächst die später zusammen mit Krampfgiften verwendeten CO_2-Konzentrationen untersucht. Bei 10% CO_2 traten weder an Katzen noch an Ratten Krämpfe auf. 20—30% CO_2, an 7 Katzen geprüft, führten nur bei einem Tier mit deutlicher Chloralose-Hyperreflexie nach einer Latenz von 3—4 min zu vereinzelten krampfartigen Zuckungen der vorderen Extremität. Die hinteren Extremitäten sprachen infolge Rückenmarksdurchtrennung auch bei diesem Tier nicht an. Bei nichtnarkotisierten Ratten lösten 25—30% CO_2 neben motorischer Unruhe und Atemerregung häufig klonische Zuckungen aus, bis nach etwa 5 min die Kohlensäure-Narkose eintrat.

Der *Einfluß von Kohlensäure auf die Strychninkrämpfe* wurde bei den Katzen im allgemeinen nach der Frequenz der Krampfbewegungen, bei Veränderung der Amplitude auch nach dieser beurteilt. *10% CO_2* führten entsprechend Tab. 1 in etwa 30% der Versuche zur Verstärkung und nie zur Abschwächung der Krämpfe.

Tabelle 1.
Wirkung von Kohlensäure auf Strychninkrämpfe der Katze.

		Anzahl der Versuche[1]	Erste Phase der CO_2-Wirkung			Zweite Phase der CO_2-Wirkung		
			Verstärkung	ohne Effekt	Abschwächung	Verstärkung	ohne Effekt	Abschwächung
			%	%	%	%	%	%
10% CO_2	ohne Rückenmarksdurchtrennung	22	23	77	—	30	70	
	mit Rückenmarksdurchtrennung	15	27	73	—	53	40	7
30% CO_2	ohne Rückenmarksdurchtrennung	21	52	43	5	38	29	33
	mit Rückenmarksdurchtrennung	28	18	65	17	14	36	50

[1] Jeder Versuch bedeutet eine CO_2-Applikation.

Bei *30% CO_2* waren die Ergebnisse nicht einheitlich. Da die Richtung des Effektes sich 2—3 min nach Beginn der CO_2-Beatmung häufig änderte, unterschieden wir bei der Auswertung eine erste und zweite Phase der CO_2-Wirkung. Entsprechend Tab. 1 und Abb. 1 traten hauptsächlich Verstärkungen der Strychninkrämpfe ein. Sekundär wurden

die Krämpfe jedoch bei etwa $^1/_3$ der Tiere durch 30% CO_2 abgeschwächt. 50% CO_2 führten nur in 3 von 9 Versuchen zur initialen Verstärkung der Strychninwirkung. Sekundär waren die Krämpfe immer abgeschwächt oder vollständig unterdrückt, nahmen allerdings häufig nach

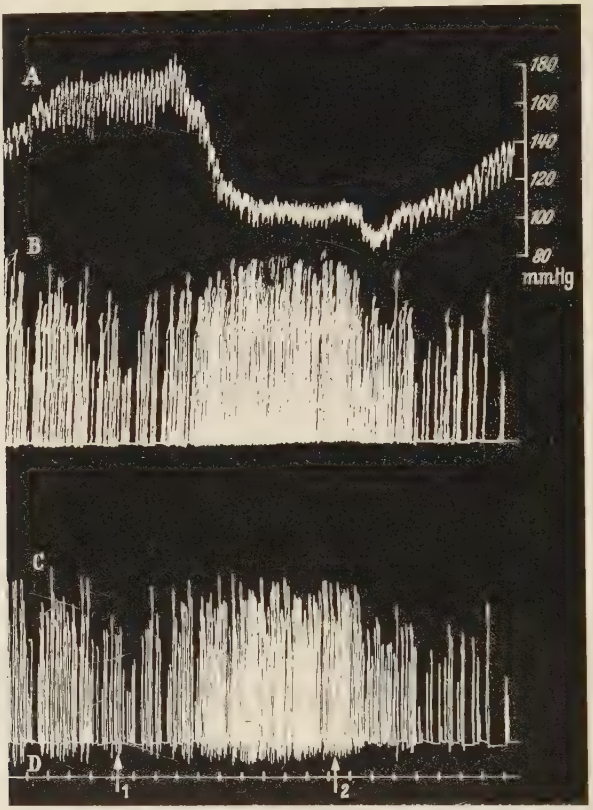


Abb. 1. Katze, 3,1 kg. *A* Blutdruck; *B* und *C* Streckbewegungen beider hinterer Extremitäten; *D* Zeitschreibung in Minuten. Zwischen *1* und *2*: 30% CO_2 in O_2. 30 min zuvor 200 γ *Strychninnitrat*/kg i.v.

dem Absetzen der CO_2-Beatmung, vor allem in ihrer Frequenz, über die ursprüngliche Intensität hinaus zu (Abb. 2).

Moussatché fand, daß CO_2 nach der Injektion von Strychnin eine leichte Verstärkung der Krampftätigkeit verursachen kann. Da dieser Effekt nach Rückenmarksdurchtrennung auf die vorderen Extremitäten beschränkt blieb, schien er durch die Krampfwirkung der Kohlensäure selbst verursacht. Zur Prüfung der Frage, ob auch die von uns beobachtete Verstärkung der Krampftätigkeit der hinteren Extremitäten von der Unversehrtheit des ZNS abhängt, verwendeten wir Katzen,

deren Rückenmark akut oder 24 Std vor Versuchsbeginn total durchtrennt worden war. Die Ergebnisse bei Beatmung mit 10% CO_2 unterschieden sich jedoch nicht wesentlich von denen an intakten Tieren (Tab. 1, Abb. 3). Auch bei 30% CO_2 kamen Verstärkungen der Strychninkrämpfe durch die Kohlensäure vor. Im Vergleich zu den Versuchen an

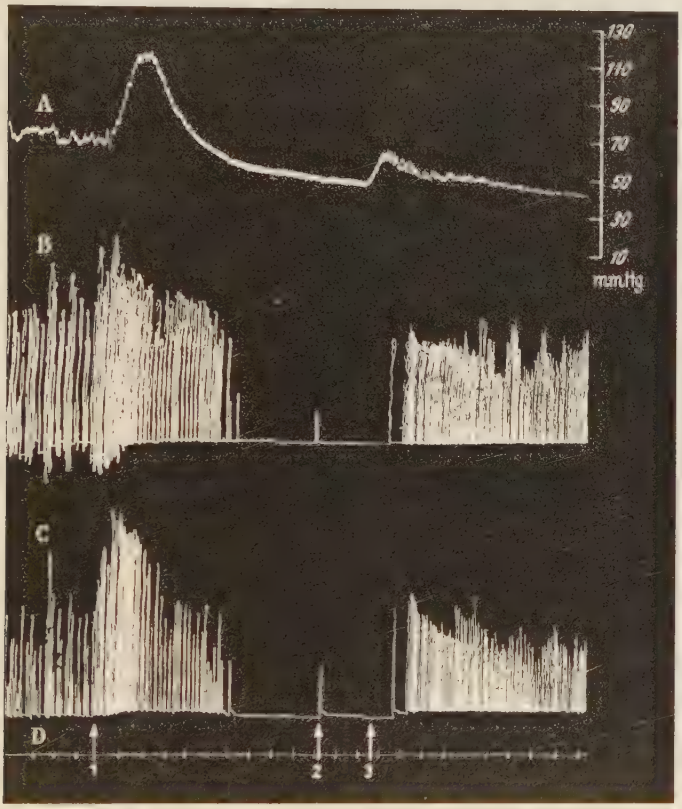


Abb. 2. Katze, 3,7 kg. 6 Tage vor Versuchsbeginn halbseitige Durchtrennung des Rückenmarks zwischen Th XI—XII (li.). *A* Blutdruck; *B* Streckbewegungen der re., *C* Streckbewegungen der li. hinteren Extremität. Zwischen *1* und *3*: Beatmung mit 50% CO_2 in O_2. Bei *2*: Auslösung des PSR. 7 min vor 1: Injektion von 50 γ *Strychnin-nitrat*/kg.

intakten Tieren traten jedoch, vor allem sekundär, die Lähmungen stärker in den Vordergrund.

In der Hoffnung auf feinere Differenzierung der CO_2-Effekte versuchten wir die Empfindlichkeit des Rückenmarks gegenüber Strychnin durch halbseitige Rückenmarksdurchtrennung (Cannon und Haimovici) bzw. einseitige Exstirpation der Spinalganglien (Luco und Eyzaguirre) zu erhöhen (8 bzw. 6 Katzen). Wir fanden jedoch im Gegensatz zu den genannten Untersuchern keine einseitige Steigerung der Strychninerregbarkeit. Auch die Wirkung von

10 und 30% CO_2 war, gemessen an der Krampftätigkeit der hinteren Extremitäten, seitengleich.

Untersuchungen an weiteren 25 Katzen mit halbseitig durchtrenntem Thorakalmark ergaben außerdem keine Unterschiede hinsichtlich der Wirkung von Acetylcholin, Nicotin und Strychnin auf den Patellarsehnenreflex beider Seiten. Zur Anerkennung von Cannons „law of denervation" auch für das ZNS bedarf es nach unserer Ansicht noch weiterer experimenteller Belege.

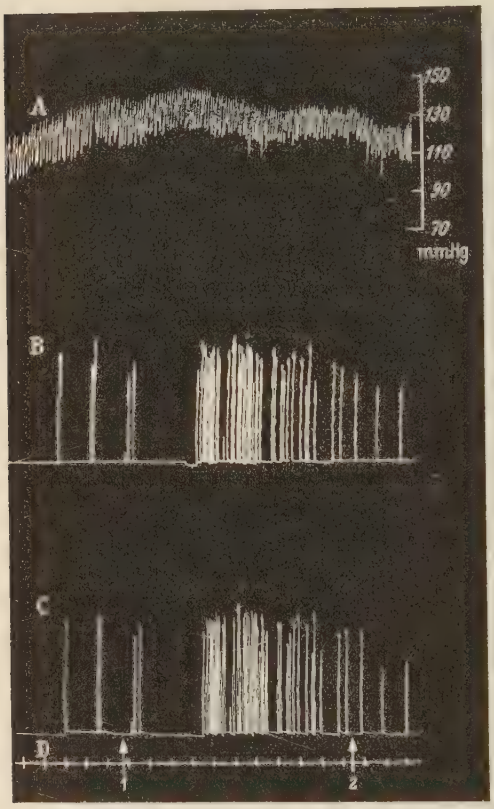


Abb. 3. Katze, 3,3 kg, 24 Std nach Rückenmarksdurchtrennung in Höhe von Th IX. *A* Blutdruck; *B* und *C* Streckbewegungen beider hinterer Extremitäten; *D* Zeitschreibung in Minuten. Zwischen *1* und *2*: Beatmung mit 10% CO_2 in O_2, 20 min vorher 100 γ *Strychnin-nitrat*/kg i.v.

Die von Gellhorn und Yesinick beschriebene Abhängigkeit der Krampfintensität von den Blutdruckveränderungen bei CO_2-Beatmung (Zunahme der Krämpfe bei Blutdruckabfall und umgekehrt), welche über die Pressoreceptoren zustandekommen soll, konnten wir, in Übereinstimmung mit Moussatché, nicht beobachten. In einem Teil unserer Versuche kam es zwar durch die CO_2-Beatmung, entsprechend den Angaben von Gellhorn und Yesinick, gleichzeitig zu Blutdruckanstieg und Verminderung, bzw. Blutdruckabfall und Vermehrung der Krämpfe (Abb. 1); ebenso häufig trat aber, wie in Abb. 2, die umgekehrte Reaktion ein. Meist blieb der Blutdruck jedoch trotz veränderter Krampftätigkeit konstant (vgl. Abb. 3). Besonders wichtig scheint in dieser Beziehung die Tatsache, daß die gleichen Reaktionen auch bei durchtrenntem Rückenmark möglich sind, wo Einflüsse des Carotissinus auf die Krampftätigkeit wohl kaum in Frage kommen.

Die Ergebnisse mit Strychnin und CO_2 konnten im wesentlichen auch an *wachen Ratten* bestätigt werden, wo 10% CO_2 zur Senkung der Krampfschwellen führten (Abb. 4). 30% CO_2, die zusammen mit *Strychnin* und *Brucin* geprüft wurden, wirkten ähnlich, nur daß es dabei sekundär zur Kohlensäurenarkose kam. Die Strychnin- und Brucinkrämpfe ließen sich durch ihren spezifischen Charakter gut von den Kohlensäurekrämpfen abtrennen.

Die Krämpfe nach *Cardiazol*[1] und *Pikrotoxin* (10—40 bzw. 0,15 mg/kg) wurden an der narkotisierten Katze durch CO_2-Konzentrationen von 2,5—10% in 23 von 42 bzw. 4 von 8 Versuchen abgeschwächt. Die *Coramin*[2]-Krämpfe waren in allen 27 Versuchen mit 5—10% CO_2 vermindert. 20—30% CO_2 führten auch bei Cardiazol und Pikrotoxin immer zur Unterdrückung der Konvulsionen. Auch an Tieren mit durchtrenntem Rückenmark, wo höhere Dosen von Cardiazol, Pikrotoxin und Coramin zur Erzeugung von Krämpfen benötigt wurden, beobachteten wir nie Verstärkungen der Krämpfe. Dasselbe gilt für dekapitierte Katzen. Bei Ratten löschten 25—30% CO_2 die Krampfwirkung von Cardiazol, Azoman und Pikrotoxin ebenfalls aus.

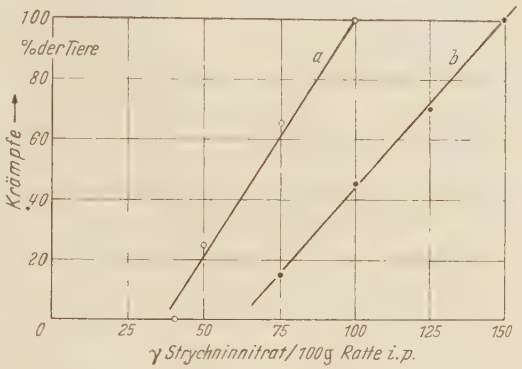


Abb. 4. Die Wirkung von 10% CO_2 in O_2 auf die Strychninkrämpfe von 20 Ratten. *a*) in 10% CO_2; *b*) Kontrollen ohne CO_2.

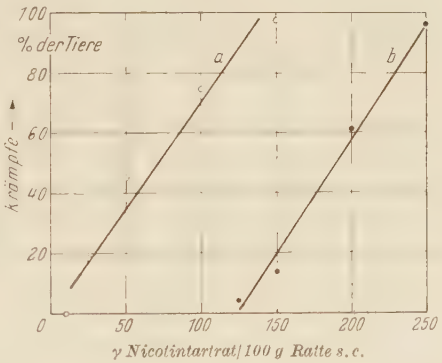


Abb. 5. Der Einfluß von 30% CO_2 in O_2 auf die Nicotinkrämpfe von 23 Ratten. *a*) in 30% CO_2; *b*) Kontrollen ohne CO_2.

Die Krampfschwellen für *Nicotin* wurden entsprechend Abb. 5 durch 25—30% CO_2 herabgesetzt. Die Abtrennung der Nicotinkrämpfe von den CO_2-Krämpfen war jedoch nicht so einfach wie bei Strychnin und Brucin. Typisch für die gleichzeitige Einwirkung von Nicotin und CO_2 war das Erscheinen dreier besonderer Krampftypen: Meist traten zuerst inspirationssynchrone klonische Zuckungen auf, die weder bei Nicotin noch CO_2 allein vorkamen; es folgten atmungsunabhängige Schüttelkrämpfe und schwere, mit der bekannten Nicotinapnoe einhergehende tonisch-klonische Konvulsionen. Die Schwelle für die Nicotinapnoe wurde durch 25—30% CO_2 von 200 auf 100 γ/kg herabgesetzt. Weitere Einzelheiten über die Versuche an Ratten finden sich in der Dissertation von Lüders.

[1] Cardiazol = Pentamethylentetrazol.

[2] Coramin = Pyridin-β-Carbonsäurediäthylamid.

Diskussion.

Die vorliegenden Untersuchungen ergaben einerseits eine Abschwächung der Krampfwirkung von Cardiazol, Azoman, Pikrotoxin und Coramin durch 5—30% CO_2. Die Krampfwirkung von Strychnin und Brucin dagegen wurde durch 10% CO_2, die von Nicotin durch 30% CO_2 in der Regel verstärkt. Erst bei länger dauernder Zufuhr höherer CO_2-Konzentrationen kam es auch hier, meist nach einer initialen Verstärkung, zur Abschwächung der Konvulsionen. Es fragt sich, worauf dieser verschiedenartige Einfluß von CO_2 beruht.

Man könnte einmal annehmen, daß die mit der CO_2-Inhalation verknüpften chemischen oder physikalisch-chemischen Reaktionen den nicht näher bekannten Erregungsmechanismus der einzelnen Krampfgifte — unabhängig von der anatomischen Lokalisation des Krampfvorganges — in charakteristischer Weise beeinflussen. Eine zweite Erklärung wäre, daß die Kohlensäure in Abhängigkeit vom zentralnervösen Angriffspunkt der Krampfgifte verschieden wirken kann. Für die letztere Auffassung spricht ein gewisser Zusammenhang zwischen der Richtung des CO_2-Effektes und dem grob anatomisch definierten Angriffspunkt der Krampfgifte; Cardiazol, Azoman und Pikrotoxin (Krämpfe durch CO_2 abgeschwächt) haben spezifische Affinitäten zum Gehirn, Strychnin und Brucin zu den receptorischen Anteilen des Rückenmarks. Auch für Nicotin liegen zwar Hinweise über spinal erregende Wirkungen vor (Taugner u. Culp); es ist aber fraglich, ob daraus Schlüsse auf den Ursprung der Nicotinkrämpfe erlaubt sind.

Das Verhalten von Coramin spricht jedoch gegen die Annahme von Beziehungen zwischen dem Angriffspunkt der Krampfgifte und der Richtung des CO_2-Effekts: Coramin wirkt nach Hahn vorwiegend auf die niederen Abschnitte des ZNS; die Coraminkrämpfe wurden jedoch, ähnlich wie die Cardiazolkrämpfe, durch CO_2 ausschließlich abgeschwächt. Der entscheidenden Bedeutung des regional verschiedenen Angriffspunktes widerspricht auch unser Befund, daß die durch höhere Dosen von Cardiazol und Pikrotoxin ausgelösten Krampfbewegungen der hinteren Extremitäten an Tieren mit durchtrenntem Rückenmark — wieder im Gegensatz zu den Strychninkrämpfen — nicht verstärkt werden.

Aus den Rückenmarkswirkungen der Kohlensäure selbst ergeben sich keine sicheren Anhaltspunkte zur Deutung der verschiedenen Beeinflussung der Krampferregbarkeit: CO_2 allein soll am Rückenmark ausschließlich lähmend wirken (Lueken, Brooks u. Eccles, Taugner u. Culp). Die Hirnrinde könnte lediglich, wie durch andere narkotisch wirkende Stoffe, durch CO_2 leichter narkotisierbar sein als das Rückenmark. Dieser quantitative Unterschied kann jedoch die verschiedenartige Wirkung der CO_2 auf einzelne Krampfgifte auch nicht erklären, da

man sonst wenigstens bei niedrigen CO_2-Konzentrationen eine verstärkte Krampfwirkung von Cardiazol, Azoman oder Pikrotoxin erwarten müßte. Dies war in unseren Versuchen an Katzen jedoch nicht der Fall.

Bemerkenswert sind zwei besondere *vasomotorische Reaktionen* des Rückenmarks, die theoretisch zur erhöhten Krampferregbarkeit führen könnten, im Krampfanfall jedoch nicht geprüft sind. So führt die Kohlensäure nach Kety und Schmidt am Gehirn zwar zur Vasodilatation; am Rückenmark kommen dagegen nach Field u. Mitarb. auch Durchblutungsverminderungen vor. Ähnliches gilt nach diesen Autoren auch für Adrenalin, das nach Wilke und Conrath sowie Eichholtz und Roesch unter der Wirkung von CO_2 vermehrt sezerniert wird.

Versuche mit lokaler Applikation von Krampfgiften müßten die Frage nach der überwiegenden Bedeutung von Angriffspunkt oder Erregungsmechanismus entscheiden können. Nach Gellhorn und French werden die durch lokale Applikation von Strychnin erzeugten Krampfpotentiale durch CO_2 verstärkt. Die Erregbarkeit der Großhirnrinde soll dabei infolge Ausstrahlung hypothalamischer, durch CO_2 ausgelöster Impulse erhöht werden. Nach Durchtrennung der Verbindungen zum Stammhirn führten dagegen 10, vor allem aber 30% CO_2 zur Abschwächung der Strychnin-spikes. Die durch Pikrotoxin ausgelösten Krampfpotentiale der nicht isolierten Hirnrinde sollen nach Gellhorn und Heymans durch 10% CO_2 ebenfalls verstärkt werden. Diese Verstärkung steht jedoch im Widerspruch zu der von Gellhorn und Yesinick beschriebenen Abschwächung der durch die i.v. Injektion von Pikrotoxin ausgelösten Krampfbewegungen unter CO_2-Beatmung. Nach Kornmüller und Noell werden zwar die „Krampfstromeinzelabläufe" (spikes) der Hirnrinde bei lokaler Applikation von Strychnin durch CO_2 verstärkt, die „Krampfstromanfälle" dagegen abgeschwächt. Moussatché fand bei corticaler Strychninapplikation eine Abschwächung der Krampfbewegungen durch CO_2. Diese widerspruchsvollen Ergebnisse lassen sich wohl nicht zur endgültigen Beantwortung der eingangs gestellten Fragen verwerten.

Eine Ausstrahlung hypothalamischer Impulse in caudaler Richtung spielt bei der Beeinflussung der spinalen Strychninwirkung offenbar keine entscheidende Rolle: Die Strychninkrämpfe der hinteren Extremitäten wurden in unseren Versuchen auch nach Durchtrennung des Thorakalmarks durch CO_2 verstärkt (vgl. Tab. 1). Über die Lokalisation dieser CO_2-Wirkung im Rückenmark, etwa an den Interneuronen, liegen keine Anhaltspunkte vor, da die Wirkung von Strychnin auf multisynaptische Reflexe durch CO_2 nicht gesteigert wird (vgl. Taugner u. Culp). Die Versuche mit segmentärer Durchtrennung der hinteren Wurzeln schließen wohl auch modifizierende Einflüsse der Peripherie aus. Zur Klärung der offenen Fragen wäre eine Erweiterung der Versuche mit lokaler Applikation verschiedener Krampfgifte bei Verwendung verschiedener CO_2-Konzentrationen unter Einbeziehung des Rückenmarks wünschenswert.

Zusammenfassung.

Die vorliegenden Untersuchungen ergaben, daß die Kohlensäure nicht nur, wie bei Cardiazol, Azoman, Pikrotoxin und Coramin zur Abschwächung, sondern, wie bei Strychnin, Brucin und Nicotin, auch zur

Verstärkung von Krämpfen führen kann. Die Verstärkung der Krampfwirkung von Strychnin spielt sich im Rückenmark ab.

Die Frage nach den Ursachen dieser verschiedenartigen Reaktion auf CO_2, als welche Besonderheiten des Erregungsmechanismus oder Unterschiede im regionalen Angriffspunkt einzelner Krampfgifte in Frage kommen, wird diskutiert.

Literatur.

Barger, G., and H. H. Dale: Chemical structure and sympathicomimetic action of amines. J. of Physiol. **41**, 19 (1910). — Brooks, C. McC, and J. C. Eccles: A study of the effects of anaesthesia and asphyxia on the mono-synaptic pathway through the spinal cord. J. of Neurophysiol. **10**, 349 (1947). — Cannon, W. B., and A. Haimovici: The sensitization of motoneurones by partial „denervation". Amer. J. Physiol. **126**, 731 (1939). — Eichholtz, F., u. E. Roesch: Pharmakologische Reaktionen an den Synapsen des NNmarks. Arch. internat. Pharmacodynamie **78**, 521 (1949). — Field, E. J., J. Grayson and A. F. Rogers: Observations on the blood flow in the spinal cord of the rabbit. J. of Physiol. **114**, 56 (1951). — Gellhorn, E., and L. A. French: Carbon dioxide and cortical spike frequency. Arch. internat. Pharmacodynamie **93**, 429 (1953). — Gellhorn, E., and C. Heymans: Differential action of anoxia, asphyxia and carbon dioxide on normal and convulsive potentials. J. of Neurophysiol. **11**, 261 (1948). — Gellhorn, E., and L. Yesinick: Significance of carotid sinus reflexes for effects of anoxia and carbon dioxide on convulsions. Amer. J. Physiol. **137**, 404 (1942). — Hahn, F.: Untersuchungen über die Angriffspunkte von Cardiazol und Coramin. I. Über die Krampf- und Weckwirkung. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **205**, 552 (1948). — Hendley, Ch. D., H. W. Davenport and J. E. P. Toman: Effects of acid-base changes on experimental convulsive seizures. Amer. J. Physiol. **153**, 580 (1948). — Kety, S. S., and C. F. Schmidt: The effects of altered arterial tensions of carbon dioxide and oxygen on cerebral blood flow and on cerebral oxygen consumption of normal young men. J. Clin. Invest. **27**, 484 (1948). — Kornmüller, A. E., u. W. Noell: Über den Einfluß der Kohlensäurespannung auf bioelektrische Hirnrindenphänomene. Pflügers Arch. **247**, 660 (1944). — Luco, J. V., and C. Eyzaguirre: Inhibitory influences on the sensitivity of spinal cord neurones. Acta physiol. lat. amer. **24**, 33 (1953). — Lüders, D.: Einfluß der Kohlensäure auf die Nicotin- und Strychninkrämpfe der Ratten. Dissertation Heidelberg 1953. — Lueken, B.: Über die Wirkung der Kohlensäure auf das Rückenmark. Z. Biol. **100**, 373 (1940). — Moussatché, H.: Inhibitory action of carbon dioxide on experimental convulsions. Memórias do institudo Oswaldo Cruz **47**, 115 (1950). — Pollock, G. H.: Central inhibitory actions of carbon dioxide. J. of Neurophysiol. **12**, 315 (1949). — Ryan, A. H., and C. C. Guthrie: Control of spasms by asphyxiation. Amer. J. Physiol. **22**, 440 (1908). — Taugner, R., u. W. Culp: Über die Wirkung von Nicotin auf das Rückenmark der Katze. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **220**, 423 (1953). — Wieland, H., u. R. L. Mayer: Der Anteil der Kohlensäure an der Wirkung der Hirnkrampfgifte. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **95**, 5 (1922). — Wilke, G., u. P. Conratii: Studien über Adrenalin-Ausschüttung aus dem Nebennierenmark. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **203**, 178 (1944).

cand. med. D. Langnickel, Pharmakologisches Institut der Universität Heidelberg.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 224, S. 443—451 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. F. Eichholtz).

Zur sympatholytischen, adrenolytischen und noradrenolytischen Wirkung der Phenothiazine * **.

Von
M. v. Bubnoff, D. Hoffmann, E. Schmid und R. Taugner.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 21. Oktober 1954.)

In früheren Versuchen war die Wirkung von Hydergin, Atosil, Antistin, Novocain und Magnesiumsulfat auf die Nierenischämie bei elektrischer Reizung des Plexus renalis untersucht worden (Eichholtz u. Mitarb.). Die Anordnung schien — abgesehen von speziellen Fragestellungen bezüglich der Nierendurchblutung — auch ganz allgemein zum Studium pharmakologischer Reaktionen an sympathischen Gefäßnerven-Endigungen geeignet. In dieser Arbeit sollte diese Möglichkeit zur Bestimmung der sympatholytischen Wirkungsstärken einiger Phenothiazine sowie von Antistin und DHE im Vergleich zur sympatholytischen, adrenolytischen und noradrenolytischen Wirkung an der Nickhaut als gebräuchlichem Testobjekt ausgenützt werden.

Die von Eichholtz u. Mitarb. zur Durchblutungsmessung verwendeten Clearance-Methoden sind bei ischämischen Zuständen der Niere mit einer Reihe von Fehlerquellen behaftet. Für die vorliegenden Untersuchungen wurde daher die blutige Messung des Nierendurchflusses mit dem automatischen bubble-flow-meter von Braun, Althoff u. Taugner vorgezogen.

Versuchsanordnung. Die Versuche wurden an Katzen im Gewicht von 1,8—4,4 kg in Urethan-Chloralose-Narkose (250 bzw. 60 mg/kg) durchgeführt. Nach medianer Eröffnung des Abdomens wurden bei einer — meist der li. — Niere Vene und Arterie mit den anliegenden sympathischen Nervenfasern vorsichtig freipräpariert. Anschließend führten wir in die Nierenvene eine Glaskanüle ein und leiteten das Blut*** zur Messung des Durchflusses in das bubble-flow-meter. Die Durchblutung wurde mit dem Ordinatenschreiber von Braun-Melsungen auf einem Rußkymographion registriert. Die Rückführung des Blutes erfolgte in die zentralen Stümpfe beider Jugularvenen. Zur Reizung des Plexus renalis verwendeten wir chlorierte, mit Paladon isolierte Silberelektroden. Die Reizfrequenz betrug meist 40/sec, die

* Herrn Prof. Dr. F. Eichholtz zum 65. Geburtstag gewidmet.

** Eine erste vorläufige Mitteilung unserer Ergebnisse erfolgte anläßlich der 21. Tagung der Dtsch. Pharmakolog. Ges. vom 3.—6. Okt. 1954 in Saarbrücken.

*** Zur Verhütung der Blutgerinnung diente Thrombocid, für dessen Überlassung wir der Firma Dr. W. Benend, München-Solln, danken.

Impulsdauer 10 msec, die Reizstärke 2—15, gewöhnlich 5 mA. Injektionen erfolgten in eine Femoralvene, Blutdruckregistrierungen über die re. Carotis. DHE, Megaphen und Pacatal wurden in etwa 2 min, Antistin, Atosil, Padisal und Latibon in 3 bis 5 min injiziert[1].

Für die Nickhautversuche verwendeten wir Katzen, deren linkes oberes Cervicalganglion 5 Tage vor dem eigentlichen Versuch exstirpiert worden war. Diese Tiere wurden in Äthernarkose nach Barger u. Dale dekapitiert.

Die Reizung des Plexus renalis führte zu einer von der Reizstärke abhängigen Herabsetzung des Nierendurchflusses. Da dieser Effekt bei kontinuierlicher Reizung innerhalb von 5—20 min gewöhnlich abnahm, verwendeten wir zur intermittierenden Reizung folgendes Schema: Elektrische Reizung für 30 sec, 10 min Pause usw. Die Reizstärke wurde so gewählt, daß die Nierendurchblutung jeweils um mindestens 50% herabgesetzt war. 1—2 min nach Beendigung der Reizung hatte der gemessene Ausfluß wieder die ursprüngliche Höhe erreicht. Der Blutdruck stieg während der Reizung gewöhnlich um 5—10 mm Hg an. In Kontrollversuchen blieb der Effekt derartiger Reizserien bei unveränderter Elektrodenlage über 2—3 Std annähernd gleich.

Die zu prüfenden Pharmaka wurden — nach 3 Kontrollreizungen — zwischen 3. und 4. Reizperiode i.v. injiziert. Die darauffolgenden Veränderungen des Reizeffektes dienten zur Beurteilung von Wirkungsstärke und Wirkungsdauer der verwendeten Stoffe. Abschwächungen der Reizwirkung um weniger als 40% wurden nicht verwertet.

Versuchsergebnisse.

DHE verhinderte bei 2 Katzen in einer Dosis von 0,05, bei 2 weiteren von 0,1, bei 3 Tieren von 0,2 mg/kg die Ischämie bei elektrischer Reizung des Plexus renalis. Diese Wirkung dauerte bei 5 Tieren 90—100 min und war bei 2 weiteren auch nach dieser Zeit noch nicht vollständig abgeklungen. Der Blutdruck fiel während der DHE-Injektion um 15—35 mm Hg ab und blieb über längere Zeit auf einem niedrigeren Niveau (Abb. 1).

Regitin war in einem Versuch (0,1 mg/kg) ohne Wirkung. Bei 2 Tieren führten 0,1 mg/kg zur Abschwächung, 0,3 mg/kg zur Auslöschung der Reizwirkung. Im vierten Versuch wurde diese durch 0 2 mg/kg vollständig unterdrückt. Dauer der Effekte: 70—110 min; Blutdruckabfall bei der Injektion: 20—35 mm Hg. Die Wirkung von *Dibenamin* (2 Tiere) setzte 20 min nach der Injektion von 15—20 mg/kg ein. Der Reizeffekt wurde jedoch erst nach 50—70 min für mehr als 150 min vollständig unterdrückt. Die Dibenamininjektion löste u. U. für 10—50 min die bekannte initiale Sympathicuserregung mit Blutdruckanstieg und Gefäßspasmen der Niere aus.

Antistin (2,5—15 mg/kg) kam in 11 Versuchen zur Anwendung. 2,5 mg/kg (1 Versuch) waren wirkungslos. Bei 5 mg/kg (4 Versuche) war der Reizeffekt nach der Injektion um 40—70% abgeschwächt. Erst

[1] Für die Überlassung von Megaphen (Largactil, N-[3′-Dimethylamino]-propyl-3-chlorphenothiazin), Atosil (Phenergan, N-[2′-Dimethylamino-2′-methyl]-äthyl-phenothiazin), Padisal (Multergan, N-[2-Trimethyl-ammonium-2′-methyl-äthyl]-phenothiazinhydroxyd) und Latibon (Diparcol, N-[2′-Diäthylamino-äthyl]-phenothiazin) sind wir der Firma Bayer-Leverkusen zu Dank verpflichtet. Pacatal (P 391, N-Methylpiperidyl-(3)-methylphenothiazin) wurde uns freundlicherweise von der Firma Promonta-Hamburg, DHE (Dihydroergotamin) von der Firma Sandoz-Nürnberg, Antistin (Imidazolin-methyl-benzylanilin) von der Firma Ciba A.G.-Wehr/Baden zur Verfügung gestellt.

eine Dosis von 10—15 mg/kg (6 Versuche) vermochte die Reizwirkung vollständig zu unterdrücken. Die Wirkungsdauer von Antistin schwankte zwischen 20 und 60 min. Der Blutdruckabfall bei der Injektion betrug — je nach Dosierung — 10—50 mm Hg.

Von den geprüften Phenothiazinkörpern besaß *Megaphen* die stärkste gefäßspasmolytische Wirkung. 0,1—0,2 mg/kg waren ohne Effekt. 0,25—2 mg/kg unterdrückten — mit einer Ausnahme bei 0,5 mg — die Reizwirkung vollständig (Tab. 1). Die Dauer dieser Effekte war mit mindestens 50 min im Vergleich zu den anderen Phenothiazinen

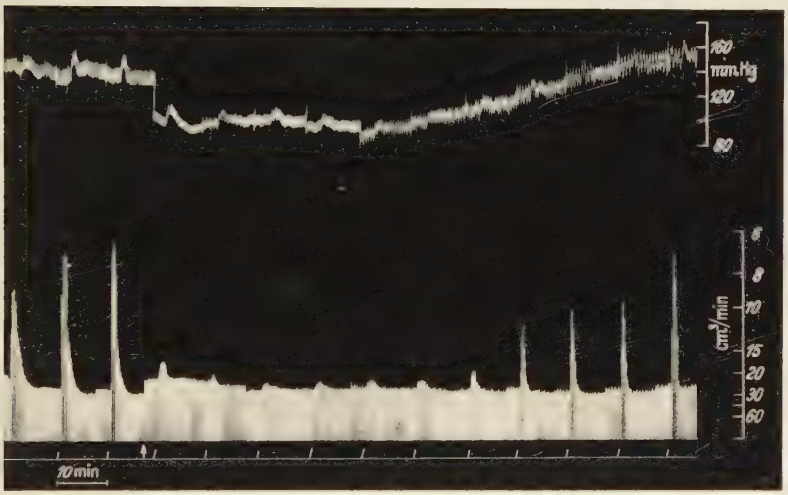


Abb. 1. Wirkung von DHE auf Gefäßspasmen der Niere, erzeugt durch elektrische Reizung des Plexus renalis einer Katze. — Oben: Blutdruck. Unten: Nierendurchblutung. Anstieg der Kurve bedeutet Vasokonstriction der Niere. Beim Signal jeweils elektrische Reizung des Plexus renalis für 30 sec. ↑ = i.v. Injektion von 0,1 mg DHE/kg.

Tabelle 1. *Wirkung von Megaphen auf die Nierenischämie bei elektrischer Reizung des Plexus renalis.*

Dosis in mg/kg	Abschwächung der Reizwirkuug in %	Wirkungsdauer in min	Blutdruckabfall bei der Injektion in mm Hg
0,1	0		
0,2	0	—	5
0,25	100	50	20
0,5	100	120	40
0,5	60	90	10
0,5	100	120	10
0,5	100	100	5
1,0	100	90	30
1,0	100	120	20
1,0	100	70	20
2,0	100	110	40
5,0	100	120	30

besonders lang, die blutdrucksenkende Wirkung im Vergleich zur sympatholytischen Wirkungsstärke auffallend gering (Abb. 2). In einem Versuch führte selbst die etwa 20fach überschwellige Dosis von 5 mg/kg nur zu einer Blutdrucksenkung um 30 mm Hg.

In 7 Versuchen wurde *Atosil* (5—10 mg/kg) verwendet. 5 mg/kg (1 Versuch) verminderten den Reizeffekt um 40%, 8 mg/kg (1 Versuch) um 80% und 10 mg/kg in einem von 5 Versuchen um 50%. In 4 weiteren

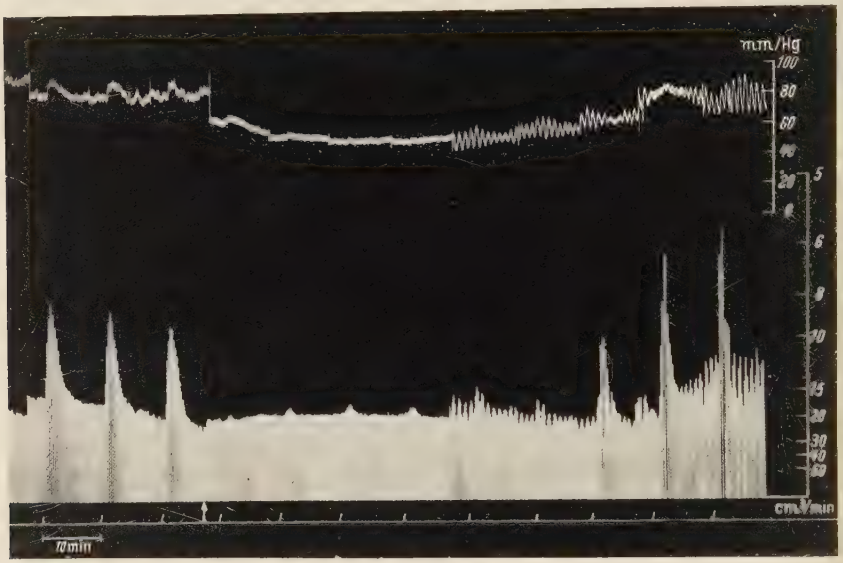


Abb. 2. Wirkung von Megaphen auf Gefäßspasmen der Niere, erzeugt durch elektrische Reizung des Plexus renalis einer Katze. — Oben: Blutdruck. Unten: Nierendurchblutung. Anstieg der Kurve bedeutet Vasokonstriction der Niere. Beim Signal jeweils elektrische Reizung des Plexus renalis für 30 sec. ↑ = i.v. Injektion von 1,0 mg Megaphen/kg.

Versuchen mit 10 mg Atosil/kg war die Reizwirkung unmittelbar nach der Injektion vollständig unterdrückt. Diese Effekte dauerten 10—30 min (Abb. 3). Der Blutdruckabfall betrug 20—60 mm Hg und entsprach damit etwa dem von Antistin. *Padisal* war in einem Versuch (5 mg/kg) wirkungslos. In einem weiteren Versuch vermochten 5, bei 2 weiteren Tieren 10 mg/kg die Nierenischämie vollständig zu verhindern. Die Wirkung war nach 10—20 min wieder abgeklungen. Die Injektion von 10 mg Padisal/kg führte in einem Fall zu vorübergehendem Atemstillstand. Der Blutdruck fiel trotz langsamer Injektion unter Umständen vorübergehend um 100 mm Hg ab (Tab. 2). Die Verabreichung von *Latibon* zeigte erst bei der Dosis von 10—15 mg/kg eine deutliche Wirkung: Die der Injektion folgende Reizung war bei einem Versuch um 40% abgeschwächt, bei einem weiteren ganz unterdrückt (Tab. 2). Schon der darauffolgende Reiz war in seiner Wirkung nicht mehr

beeinträchtigt. Auch bei Latibon fiel die kurzdauernde, starke Blutdrucksenkung auf. Nach *Pacatal* (4 mg/kg) war ebenfalls nur der erste Reiz nach der Injektion ausgelöscht. Gefäßspasmolytische Wirkung und Blutdrucksenkung dauerten auch hier nur etwa 10 min.

Zur Ergänzung prüften wir die Wirkung von Megaphen, Atosil, Padisal und Antistin auf die durch Adrenalin, Noradrenalin und postganglionäre elektrische Reizung ausgelösten Kontraktionen der Nickhaut. Die zur Auslöschung der Reizwirkung erforderlichen Dosen unterschieden sich dabei nicht wesentlich von den bei der Plexusreizung wirksamen, mit Ausnahme von Megaphen, bei dem in einem Versuch sogar schon 0,05 mg/kg den Reizerfolg für 40 min unterdrückten. Die Kontraktionen der Nickhaut auf Adrenalin und Noradrenalin wurden dagegen durch Dosen abgeschwächt, welche die Wirkung der elektrischen Reizung noch nicht beeinträchtigten. Während die pressorische Wirkung von Noradrenalin, wie für Megaphen bekannt, auch nach Atosil, Padisal und Antistin viel weniger abgeschwächt wurde als die Adrenalinwirkung, waren im Gegensatz dazu die

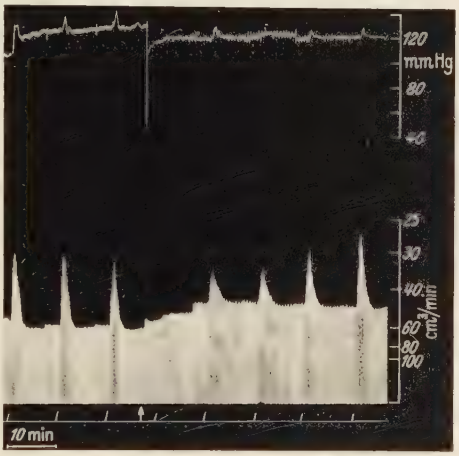


Abb. 3. Wirkung von Atosil auf Gefäßspasmen der Niere, erzeugt durch elektrische Reizung des Plexus renalis einer Katze. — Oben: Blutdruck. Unten: Nierendurchblutung. Anstieg der Kurve bedeutet Vasokonstriction der Niere. Beim Signal jeweils elektrische Reizung des Plexus renalis für 30 sec. ↑ = i.v. Injektion von 10 mg Atosil/kg.

Tabelle 2.

Pharmakon	Dosis in mg/kg	Anzahl der Versuche[1]	Wirkungsdauer in min	Blutdruckabfall bei der Injektion in mm Hg
DHE	0,1 — 0,2	5	90—100	15— 35
Regitin	0,1 — 0,3	3	70—110	20— 35
Dibenamin . . .	15,0 —20,0	2	> 150	vergl. Text
Antistin	5,0 —15,0	9	20— 60	10— 50
Megaphen . . .	0,25— 5,0	10	50—120	5— 40
Pacatal	4,0	2	10	15— 20
Padisal	5,0 —10,0	3	10— 20	30—100
Atosil	5,0 —10,0	7	10— 30	20— 60
Latibon	10,0 —15,0	2	10	70— 90

[1] Es wurden nur die positiven Versuche (Abschwächung der Reizwirkung um mindestens 40%) verwertet.

durch Adrenalin und Noradrenalin ausgelösten Kontraktionen der denervierten Nickhaut meist gleichmäßig vermindert. Als Beispiel seien 4 charakteristische Versuche an dekapitierten Katzen aufgeführt. Die injizierten Mengen von Megaphen, Padisal, Antistin und Atosil stellen bei der Plexusreizung Schwellendosen dar.

Tabelle 3.

Pharmakon	Dosis in mg/kg	Abschwächung der pressorischen Wirkung in %		Abschwächung der Nickhautkontraktionen in %		Abschwächung der Nickhautkontraktionen auf postggl. Reizung in %
		Adrenalin	Noradrenalin	Adrenalin	Noradrenalin	
Megaphen . . .	0,2	70	25	75	80	50
Padisal	5,0	100	50	100	65	25
Antistin	5,0	30	25	65	50	0
Atosil	5,0	35	0	40	35	0

Auf Grund derartiger Versuche würde die Reihenfolge der untersuchten Pharmaka, geordnet nach den adrenolytischen, noradrenolytischen und sympatholytischen Wirkungsstärken an der Nickhaut, lauten: Megaphen, Padisal, Antistin und Atosil. Ausführlichere vergleichende Untersuchungen mit Berücksichtigung von Latibon und Pacatal sind geplant.

Diskussion.

Spasmen der Nierengefäße haben seit Volhard u. a. die Aufmerksamkeit der Kliniker erregt; sie wurden aber letzthin besonders diskutiert in Verbindung mit dem Schockzustand des Menschen; dabei hat sich nämlich gezeigt, daß es zwar gewöhnlich leicht ist, die bekannte Kreislaufschwäche zu beherrschen; jedoch geht der Betroffene trotzdem häufig zugrunde unter dem Bilde einer spastisch bedingten lower nephron nephrosis, die mit den heutigen Arzneistoffen nicht beherrschbar ist. Die Suche nach geeigneten Stoffen zur Beeinflussung von Nierengefäßspasmen erscheint daher vordringlich.

Der Vorteil unserer Versuchsanordnung besteht darin, daß abstufbare Vasokonstrictionen erzeugt werden, während sonst die Prüfung gefäßspasmolytischer Wirkungen an Tieren erfolgt, deren Gefäßtonus durch Narkose und Operation meist in unübersichtlicher Weise spontan erhöht ist. Nach Houck sowie Rothlin u. Mitarb. soll allerdings die elektrische Reizung nur in einzelnen Nierenbezirken zur Gefäßverengerung führen. Humorale Faktoren sind an dieser Vasokonstriktion nicht beteiligt (vgl. Eichholtz u. Mitarb.). Kontrollversuche mit Dosen von *Pendiomid*, welche die ganglioplegischen um das 10-fache überschreiten (15 mg/kg), ergaben keine Abschwächung des Reizeffektes. Daraus geht hervor, daß tatsächlich postganglionär gereizt wurde.

Das als Vergleichssubstanz verwendete DHE verhielt sich wie Hydergin (Rothlin; Eichholtz u. Mitarb.). Verminderungen der Nierendurchblutung, wie sie von Reubi für DHE und Hydergin beim Menschen beschrieben wurden, kamen nicht vor (vgl. Eränkö u. Karvonen, Deutsch u. Markoff).

Während der sympatholytische Effekt von Megaphen bekannt war, liegen unseres Wissens keine Angaben über das Verhältnis der Wirkungsstärken einzelner Phenothiazine vor. An der Niere verhielten sich die Schwellendosen von Megaphen, Pacatal, Atosil, Padisal und Latibon etwa wie $1 : {}^1/_{16} : {}^1/_{20} : {}^1/_{20} : {}^1/_{40}$. An der postganglionär gereizten Nickhaut war die Relation ähnlich.

Megaphen zeichnete sich durch seine starke und langandauernde sympatholytische Wirkung bei geringer Blutdrucksenkung aus: Die niedrige Schwellendosis von 0,25 mg/kg spricht, in Verbindung mit der großen therapeutischen Breite der Substanz, auch bei Umrechnung auf das Gewicht des Menschen dafür, daß bei der therapeutischen Verwendung von Megaphen unter anderen auch mit sympatholytischen Effekten zu rechnen ist.

In orientierenden Versuchen mit der zum Zweck der Hibernation empfohlenen Kombination von Megaphen, Atosil und Dolantin erwies sich ausschließlich Megaphen als wirksam. Für die Behandlung von Nierenspasmen im Schockzustand scheint diese Kombination daher unrationell, da der Arzt durch die Nebenwirkungen von Dolantin und Atosil daran gehindert werden könnte, die eigentlich wirksame Substanz genügend hoch zu dosieren.

Zur Unterdrückung der durch postganglionäre Reizung ausgelösten Nickhautkontraktionen wurden wesentlich höhere Dosen benötigt als zur Auslöschung der Adrenalin- und Noradrenalinwirkung. Die Phenothiazine verhalten sich darin wie verschiedene andere sympatholytische Stoffe, welche nach Nickerson ebenfalls zuerst die auf humoralem Weg ausgelöste Erregung sympathisch innervierter Organe abschwächen.

Da die Wirkung von Adrenalin und Noradrenalin auf die Nierengefäße durch druckpassive Durchblutungsveränderungen modifiziert wird, verzichteten wir hier auf den Vergleich mit der elektrischen Reizung des Plexus renalis. Nach einer älteren Arbeit von Barry, welcher die Wirkung von Ergotamin auf die Verminderung des Nierenvolumens bei Injektion von Adrenalin und elektrischer Reizung des Splanchnicus untersuchte, dürfte für die Nierengefäße ähnliches gelten.

Die bei postganglionärer Reizung von Plexus renalis und Halssympathicus ermittelte Relation der sympatholytischen Wirkungsstärken der Phenothiazine gilt im wesentlichen auch für die adrenolytische Wirkung an der denervierten Nickhaut (vgl. Malorny). Ähnliches gilt nach unseren Versuchen auch für den Antagonismus gegen Noradrenalin.

Die zur Abschwächung der Noradrenalinwirkung an der Nickhaut benötigten Dosen waren nicht deutlich größer als die adrenolytisch wirksamen. Dieser Befund steht im Gegensatz zu den Verhältnissen am Blutdruck der dekapitierten Katze, wo die adrenolytische Wirkung

aller Phenothiazine, wie von Courvoisier u. Mitarb., Marquardt u. Schumacher, sowie Huidobro für Megaphen beschrieben, wesentlich stärker ist als die noradrenolytische.

Die wirksame Dosis von Antistin (5—15 mg/kg) entsprach an Niere und Nickhaut etwa der von Atosil. Auch die durch kleinere Dosen an der Nickhaut erzielte adrenolytische und noradrenolytische Wirkung war bei beiden Stoffen etwa gleich. Im Gegensatz dazu besitzt Atosil am durchströmten Kaninchenohr, an der isolierten Samenblase und an der Rindercarotis im Vergleich zu Antistin eine 3—10fach stärkere adrenolytische (bzw. noradrenolytische) Wirkung (Fleckenstein; Haas; Buchholz, Hahn u. Plester). In den Versuchen von Eichholtz u. Mitarb. war Atosil an der Niere sogar wirkungslos.

Diese verschiedene Einstufung von Antistin und Atosil zeigt, daß die an isolierten Organen gewonnenen Ergebnisse mit denen an intakten Tieren nicht übereinstimmen. Es ist ferner zu beachten, daß die adrenolytisch und noradrenolytisch wirksamen Dosen offenbar ganz allgemein niedriger liegen als die sympatholytischen. Schließlich kann, wie aus dem Unterschied der Reaktion von Blutdruck und Nickhaut hervorgeht, das Verhältnis der adrenolytischen zur noradrenolytischen Potenz für einzelne Pharmaka an verschiedenen Testobjekten voneinander abweichen. Es scheint daher bei der vergleichenden Prüfung von Pharmaka nicht nur aus prinzipiellen Gründen notwendig, die Begriffe adrenolytisch, noradrenolytisch und sympatholytisch voneinander abzutrennen. Für die Abschwächung zentral oder reflektorisch bedingter sympathischer Erregungen sollte die Bezeichnung „sympatholytisch" nicht gebraucht werden.

Zusammenfassung.

An Katzen in Urethan-Chloralose-Narkose wurde — im Vergleich zu DHE und Antistin — die Wirkung einiger Phenothiazinkörper auf die Nierenischämie bei elektrischer Reizung des Plexus renalis untersucht. Die Wirkungsstärken von Megaphen, Pacatal, Padisal, Antistin, Atosil und Latibon verhielten sich dabei etwa wie $1 : {}^1/_{16} : {}^1/_{20} : {}^1/_{20} : {}^1/_{20} : {}^1/_{10}$. Auch die Wirkungsdauer von Megaphen überragte die der anderen Phenothiazine bei weitem. Ähnliche Ergebnisse wurden bei postganglionärer elektrischer Reizung des Halssympathicus und — mit allgemein geringerer Dosierung — bei i.v. Injektion von Adrenalin und Noradrenalin an der denervierten Nickhaut dekapitierter Katzen erzielt.

Literatur.

Barry, D. T.: Some features of the pharmacological actions of yohimbine and ergotamine. Arch. internat. Pharmacodynamie **55**, 385 (1937). — Braun, W., K. H. Althoff u. R. Taugner: Bubble flow meter mit automatischer Registrierung. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 529 (1954). — Buchholz, R., F. Hahn u.

D. Plester: Über die tyraminhemmende Wirkung der Antihistaminica. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **212**, 189 (1951). — Courvoisier, S., J. Fournel, R. Ducrot, M. Kolsky et P. Koetschet: Propriétés pharmacodynamiques du chlorhydrate de chloro-3(diméthylamino-3′propyl)-10 phénothiazine (4.560 R. P.). Arch. internat. Pharmacodynamie **92**, 305 (1953). — Deutsch, E., u. Th. Markoff: Klin. Med. **1953**, 8, 105. — Eichholtz, F., R. Taugner u. W. Braun: Untersuchungen zur Behandlung renaler Ischämien. Arch. internat. Pharmacodynamie **98**, 118 (1954). — Eränkö, O., and M. J. Karvonen: Effects of some sympathicolytic agents on water diuresis and adrenaline antidiuresis in the unanaesthetised dog. Acta pharmacol. (Kopenh.) **8**, 409 (1952). — Fleckenstein, A.: A quantitative study of antagonists of adrenaline on the vessels of the rabbit's ear. Brit. J. Pharmacol. **7**, 553 (1952). — Haas, H.: Histamine und Antihistamine, I und II. Editio Cantor, 1951 u. 1952. — Houck, C. R.: Alterations in renal hemodynamics and function in separate kidneys during stimulation of renal artery nerves in dogs. Amer. J. Physiol. **167**, 523 (1951). — Huidobro, F.: Some pharmacological properties of chloro-3(dimethylamine-3′-propyl)-10-phenothiazine or 4.560 R. P. Arch. internat. Pharmacodynamie **98**, 308 (1954). — Malorny, G.: Nicotinolytische und adrenolytische Wirkungen der Ganglioplegica. Verh. dtsch. Pharmak. Ges. Bonn 1953. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 73 (1954). — Malorny, G.: Differenzierung der Spartein- und Megaphenwirkung mit Hilfe pharmakologischer Testmethoden. Anaesthesist **3**, 176 (1954). — Marquardt, P., u. Hh. Schuhmacher: Über die pressorische Bereitschaft des Blutdrucks nach Megaphen, Methylenblau und Phenothiazin. Verh. dtsch. pharmak. Ges. Bonn 1953. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 74 (1954). — Moyer, J. H., B. Kent, R. Knight, G. Morris, R. Huggins and C. A. Handley: Experimentelle und klinische Beobachtungen über die Wirkung des Chlorpromazin (SFK-2601-A). Hämodynamische und toxikologische Untersuchungen. Amer. J. Med. Sci. **227**, 3, 281 (1954). — Nickerson, M.: The pharmacology of adrenergic blockade. Pharmacol. Rev. **1**, 27 (1949). — Pocidalo, J. J., H. P. Cathala, J. Himbert et M. Tardieu: Action sur l'excitabilité des nerfs sympathiques du chlorhydrate de diméthylaminopropyl N-chlorophénothiazine (4560 R.P.). C. r. Soc. Biol. (Paris) **146**, 368 (1952). — Reubi, F.: L'action de quelques d rivés de l'ergot de seigle sur la circulation rénale. Experientia (Basel) **5**, 296 (1949). — Rothlin, F., A. Cerletti u. R. Bircher: Experimentelle Untersuchungen über die Beeinflussung renaler Ischämien durch Hydergin. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 291 (1953). — Smith, H. W.: The Kidney. Oxford 1951.

Dr. M. v. Bubnoff, Pharmakologisches Institut der Universität Heidelberg.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 224, S. 452—464 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. F. Eichholtz).

Zur Nierenausscheidung von P^{32} als Orthophosphat und Glycerophosphat*.

Von
E. Schmid, H. Ganz, W. Braun und R. Taugner**.

(Eingegangen am 21. Oktober 1954.)

Nach Eggleton und Habib wird die Clearance von anorganischem Phosphat bei der Katze durch Filtration und Rückresorption bestimmt. Führt man dagegen größere Mengen von Glycerophosphat, Phosphoglycerinsäure oder Hexosediphosphat zu, so kann es außerdem zur tubulären Sekretion von anorganischem Phosphat und Esterphosphat kommen (Eichholtz u. Starling, Taugner, v. Bubnoff u. Braun).

Die vorliegenden Versuche mit trägerfreiem, P^{32}-markiertem Glycerophosphat (GlP^{32}) sollten zur Beantwortung der Frage dienen, ob diese tubuläre P-Sekretion auch ohne wesentliche Erhöhung des Phosphatester-Spiegels im Plasma nachweisbar ist. Unsicherheiten hinsichtlich der Filtrierbarkeit von anorganischem P machten außerdem vergleichende Versuche mit $H_3P^{32}O_4$ erforderlich.

Versuchsanordnung.

Versuchstiere waren etwa 40 Katzen und 2 Hunde in Urethan-Chloralose-Narkose (250 bzw. 60 mg/kg). In den ersten Versuchen waren beide Ureteren mit Glaskanülen sondiert. Später erwies sich als zweckmäßiger, in die (durch kleinen Medianschnitt über der Symphyse freigelegte und eröffnete) Blase das kugelförmig erweiterte Ende einer Glaskanüle einzubinden. Die Glaskugel (Durchmesser etwa 0,25 cm) war zur Aufnahme des Urins siebartig durchlöchert. Wir achteten darauf, daß die Blasenwand durch die Ligatur straff anlag, die Ureterenmündungen jedoch nicht komprimiert wurden. Das Operationstrauma wird durch dieses — praktisch extraperitoneale — Verfahren auf ein Minimum reduziert, der tote Raum nicht wesentlich vermehrt. Die Kanüle wurde nach jedem Versuch zur ausreichenden Entfernung der Aktivität mit Chromschwefelsäure gespült.

Die Tiere erhielten beim Einsetzen der Narkose 50—100 cm^3 Trinkwasser per os. Creatinin (etwa 100 mg/Std) und die Phosphate wurden zusammen mit 40—60 cm^3 isotonischer NaCl-Lösung/Std in die Jugularvene infundiert. Der P-Infusion ging meist eine Anfangsinjektion voraus. Die NaCl-Infusion begann etwa 1 Std, die Creatininfusion etwa 30 min vor der ersten Clearance-Periode. Die Perioden dauerten 8—15 min. Blutentnahmen erfolgten alle 20—30 min, ohne Kanülen, direkt aus einer Femoralarterie. Die Blutproben wurden sofort nach der Entnahme in Eiswasser gekühlt und zentrifugiert, das Plasma abpipettiert. Zur Verhütung der Blutgerinnung diente Thrombocid[1].

* Herrn Professor Dr. F. Eichholtz zum 65. Geburtstag gewidmet.

** Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

[1] Der Fa. Dr. W. Benend, München-Solln, danken wir für die freundliche Überlassung von Thrombocid.

Die Plasmaspiegel wurden, nach Auftragung der Analysenwerte auf semilogarithmischem Papier, unter Berücksichtigung des toten Raums durch Interpolation gewonnen. Der tote Raum beider Nieren und des ableitenden Systems wurde mit Hilfe von P^{32} ermittelt. Nach der üblichen Anfangsinjektion des radioaktiven Materials wurde der Urin hierzu in 1 min-Perioden aufgefangen. Wir bestimmten 1. die Zeit bis zum Erscheinen der Aktivität und 2. die Zeit bis zur Einstellung eines konstanten Aktivitätsspiegels im Urin. Als „Totzeit" wurde — unter Berücksichtigung der Harnmenge — das Mittel aus beiden Werten eingesetzt.

Die Bestimmung des anorganischen P in Plasma und Urin erfolgte nach Fiske u. Subbarow. Die Radioaktivität wurde, nach entsprechender Verdünnung der auch für die P-Bestimmung verwendeten Trichloressigsäurefiltrate, im Flüssigkeitszählrohr gemessen. Zur Creatininbestimmung verwendeten wir die Methode von Lieb u. Zacherl.

Zum Vergleich der Ausscheidungsgeschwindigkeiten von endogenem und exogenem P diente in den Versuchen mit trägerfreier $H_3P^{32}O_4$ nicht, wie meist üblich, das Verhältnis der spezifischen Aktivitäten in Plasma und Urin, sondern das anschaulichere der Clearance von anorganischem P zur Clearance der Aktivität. Die Clearance der Aktivität errechneten wir nach der Formel $\frac{U.V}{P}$, indem wir neben der Diurese die — unter identischen Versuchsbedingungen gemessenen — Impulse in 1 cm^3 Urin bzw. Plasma/min einsetzten. Für die Versuche mit trägerhaltiger $H_3P^{32}O_4$ wurde das Verhältnis Clearance der Aktivität (= Clearance exogenes P): Clearance des endogenen P verwendet. Die Konzentration des exogenen P kann aus der Relation P^{32}: P in der infundierten Lösung errechnet werden. Durch Subtraktion des exogenen vom gesamten anorganischen P erhält man nach dem Vorgehen von Henry u. Mitarb. das endogene P in Plasma und Urin.

Da es uns in den Versuchen mit GlP^{32} zunächst nur auf prinzipielle Ergebnisse ankam, verzichteten wir auf die Abtrennung der in Serum und Urin noch als GlP^{32} oder, durch hydrolytische Spaltung, schon als anorganisches P^{32} vorhandenen Aktivität und berechneten die Clearance des gesamten exogenen P.

$H_3P^{32}O_4$ und GlP^{32} wurden vom Radiochemical Centre Amersham bezogen. Die Präparate waren praktisch trägerfrei[1]. GlP^{32} enthielt weder freie Phosphorsäure noch Glycerin. Trägerphosphate wurden, als Na-Salze, nach Bedarf zugesetzt.

Versuchsergebnisse.

A. Die *Versuche mit radioaktivem Orthophosphat* sollten zum Vergleich der Ausscheidungsgeschwindigkeiten des exogenen und endogenen anorganischen P dienen. Bei Annahme gleicher Rückresorptionsmechanismen sind daraus nach J. Govaerts und anderen Schlüsse auf die Filtrierbarkeit bzw. den physikalisch-chemischen Zustand des anorganischen Plasma-P möglich. Die Kenntnis der Filtrierbarkeit von anorganischem P war uns aber zur Deutung der Versuche mit Glycerophosphat erwünscht.

Die Rückresorption des im Glomerulus filtrierten anorganischen P ist beim Hund, ähnlich der Glucoserückresorption, durch ein tubuläres Maximum beschränkt, welches bei einem Plasmaspiegel von etwa 7 mg% erreicht wird (Pitts u. Alexander). Bei der Katze besteht dagegen keine derartige Beschränkung: Die rückresorbierte P-Menge stellt hier, selbst bei Plasmaspiegeln bis 50 mg%,

[1] Bei trägerfreien Präparaten ist die Menge des Elements trotz hoher Radioaktivität chemisch zu vernachlässigen.

Tabelle 1. *A. Injektion mit anschließender Infusion von trägerfreier*

Zeit in min	Diurese cm³/min	Creatinin-Clearance	anorganisches P	
			Plasma-P mg%	Clearance
0	Injektion, anschließend Infusion von trägerfreier $H_3P^{32}O_4$			
5— 15	0,5	—	5,3	1,92
15— 25	0,37	14,5	5,46	1,52
25— 35	0,36	14,7	5,63	1,48
35— 45	0,39	18,7	5,54	1,8
45— 55	0,43	20,0	5,42	2,1
55— 65	0,53	18,7	5,38	2,71
65— 75	0,31	13,4	5,34	1,86
75	Ende der Infusion von $H_3P^{32}O_4$			
75— 85	0,31	12,8	5,12	2,65
85— 95	0,34	12,6	5,17	2,86
95—105	0,3	12,4	5,23	3,14

B. Injektion mit anschließender Infusion von trägerhaltigem

Zeit in min	Diurese cm³/min	Creatinin Clearance	anorganisches P	
			Plasma-P mg%	Clearance
0	Injektion, anschließend Infusion von trägerhaltigem radioaktivem			
5— 15	0,41	17,0	16,4	8,58
15— 25	0,45	17,7	17,3	8,9
25— 35	0,45	17,7	18,2	9,0
35— 45	0,52	19,0	20,0	8,52
45— 55	0,46	15,8	21,5	7,05
55— 65	0,45	15,2	22,8	6,05
65— 75	0,46	13,7	24,0	6,01
75	Ende der Phosphatinfusion			
75— 85	0,42	17,0	19,9	7,1
85— 95	0,42	15,3	16,0	6,1
95—105	0,28	15,6	13,9	5,85
105—115	0,19	17,7	12,2	6,6
115—125	0,20	19,4	11,5	6,85

eine annähernd konstante Fraktion der filtrierten dar (Eggleton u. Habib, Taugner, v. Bubnoff u. Braun). Die Größe der Rückresorption wurde dabei, wie üblich, aus der Differenz zwischen filtriertem P (Filtrationsgröße · Plasma-P-Spiegel) und ausgeschiedenem P berechnet. Die genannten Untersucher gingen bei der Auslegung ihrer Befunde von der Voraussetzung aus, daß alles anorganische P im Plasma filtrierbar sei. Dies trifft nach älteren Experimenten für niedrige P-Spiegel tatsächlich zu. Bei Erhöhung des Plasmaspiegels durch Injektion von Orthophosphat soll dagegen der von Eichholtz u. Starling erstmals beschriebene, später besonders von L. Brull studierte, nicht filtrierbare kolloidale Ca-P-Komplex im Blutplasma erscheinen (Literatur siehe bei Henry u. Mitarb. sowie bei Taugner u. Mitarb.). Da es sich früher meist um Dialyse- bzw. Ultrafiltrationsversuche

radioaktiver Orthophosphorsäure bei einer Katze von 2,9 kg.

P^{32} Impulszahl/min in 1 cm³ Plasma	Clearance	Clearance P^{32} / Clear. anorg. P.	Clearance P^{32} / Clear. Creat.
2840	2,35	1,22	
3020	2,25	1,48	0,16
3230	2,55	1,72	0,17
3170	3,0	1,67	0,16
2980	3,9	1,85	0,19
3270	4,2	1,55	0,22
3620	2,46	1,32	0,18
2470	3,47	1,30	0,27
2060	3,57	1,25	0,28
1810	3,72	1,18	0,3

radioaktivem Orthophosphat bei einer Katze von 3,1 kg.

P^{32} Impulszahl/min in 1 cm³ Plasma	Clearance	Clearance P^{32} / Clear. anorg. P	Clearance P^{32} / Clear. endog. P	Clearance P^{32} / Clear. Creat.
Orthophosphat				
430	8,26	0,96	0,89	0,48
453	8,5	0,96	0,86	0,48
485	8,5	0,95	0,83	0,48
550	8,48	0,98	0,97	0,44
615	6,9	0,98	0,92	0,43
665	6,28	1,03	1,2	0,41
695	6,27	1,04	1,19	0,46
510	8,0	1,12	1,54	0,47
400	6,05	0,99	1,0	0,39
335	6,1	1,04	1,13	0,39
292	6,4	0,97	0,92	0,36
250	7,4	1,08	1,2	0,38

handelte, blieb ungewiß, inwiefern derartige Ergebnisse auf die Glomerulusmembran übertragbar sind.

Die Verwendung von P^{32} schien später die gleichzeitige Ermittlung der Ausscheidungsgeschwindigkeit für endogenes und exogenes (radioaktives) P am lebenden Objekt zu erlauben. Als Maßstab für die relative Eliminationsgeschwindigkeit (und damit Filtrierbarkeit) diente die spezifische Aktivität (Impulszahl/mg P) in Plasma und Urin. Angesichts der kritischen Einwände von Jacobs u. Mitarb. bleibt jedoch, wie später ausführlich diskutiert, zu bedenken, ob die methodischen Voraussetzungen zur exakten vergleichenden Bestimmung der Ausscheidungsgeschwindigkeiten gegeben sind. Die ersten Versuche dieser Art wurden von J. Govaerts an Hunden ausgeführt. Er fand nach *Injektion* von anorganischem

Tabelle 1 (Fortsetzung). *C. Infusion von trägerfreiem, anschließend von*

Zeit in min	Diurese cm³/min	Creatinin-Clearance	anorganisches P	
			Plasma-P mg%	Clearance
0	Injektion, anschließend Infusion von trägerfreiem Orthophosphat			
5— 12	2,18	64	7,1	2,18
12— 19	2,1	67	7,1	2,25
19— 26	1,73	65	7,1	1,84
26— 33	1,5	66	7,0	1,86
33— 40	1,4	69	6,9	2,0
40	zusätzliche Infusion von Trägerphosphat			
45— 52	1,36	73	15,4	15,2
52— 59	1,6	75	15,4	22,0
59— 66	1,74	77	15,4	29,2
66— 73	1,78	79	16,5	30,3
73— 79	1,65	73	17,6	29,0
79— 87	1,71	78	19,4	30,7
87— 94	1,78	76	21,2	29,6
94	Ende der Phosphatinfusion			
94—100	nicht bestimmt			
100—111	1,15	75	13,6	30,5
111 —121	1,09	76	12,9	27,8
121—131	0,95	78	12,1	21,0
131 —141	1,04	78	11,0	22,0

D. Infusion von trägerhaltigem Glycerophosphat

Zeit in min	Diurese cm³/min	Creatinin-Clearance	anorganisches P	
			Plasma-P mg%	Clearance
0	Infusion von inaktivem Glycerophosphat mit Theophyllin (5 g bzw.			
15	Injektion von 10 mC, anschließend Infusion von 25 mC GlP^{32}/Std			
20—28	0,93	7,0	7,9	7,4
28—36	1,1	8,7	8,8	9,3
36—44	0,85	8,1	9,5	8,0
44—52	nicht bestimmt			
52—60	1,13	6,9	12,3	6,8
60—68	0,83	6,6	13,9	5,6

Radiophosphor im Urin wesentlich höhere spezifische Aktivitäten als im Plasma und nahm an, daß lediglich 10% des endogenen anorganischen P filtrierbar seien. Der Rest sollte als nicht nierenfähige, äußerst labile (z. B. schon bei der Blutentnahme zerfallende) P-Verbindung unbekannter Natur vorliegen, mit der das exogene P erst nach 1—1½ Std ins Gleichgewicht kommt. Handler u. Cohn beobachteten, ebenfalls an Hunden, ein geringeres und kürzeres Überwiegen der spezifischen Urinaktivität. Da der P-Spiegel im Plasma nach Einzelinjektionen von P^{32} rasch abfällt, könnte ihrer Meinung nach dieser Effekt durch den von Govaerts ursprünglich nicht in Rechnung gesetzten toten Raum der Nieren bedingt sein. J. Govaerts fand später aber auch bei i.v. *Infusion* von

trägerhaltigem radioaktivem Orthophosphat bei einem Hund von 11,5 kg.

P^{32} Impulszahl/min in 1 cm³ Plasma	Clearance	Clearance P^{32} / Clear. anorg. P	Clearance P^{32} / Clear. Creat.
782	1,6	0,73	0,025
764	1,58	0,7	0,023
764	1,56	0,84	0,024
772	1,58	0,85	0,024
808	1,68	0,84	0,024
854	13,4	0,9	0,18
812	22,7	1,03	0,3
773	28,0	0,96	0,36
813	31,5	1,04	0,39
856	29,5	1,02	0,4
890	32,0	1,04	0,41
923	30,6	1,03	0,4
513	30,3	0,99	0,4
462	24,5	0,89	0,32
400	20,5	0,97	0,26
350	19,8	0,9	0,25

bei einer Katze von 2,5 kg.

P^{32} Impulszahl/min in 1 cm³ Plasma	Clearance	Clearance P^{32} / Clear. anorg. P	Clearance P^{32} / Clear. Creat.
60 mg/Std)			
1920	9,22	1,25	1,32
1980	10,72	1,15	1,24
2000	9,75	1,22	1,2
2800	8,27	1,22	1,2
3150	6,55	1,17	0,99

Radiophosphor die spezifische Aktivität des Urins erhöht. Wesentlich modifizierende Einflüsse des toten Raums wurden von ihm auch nach Versuchen mit Ca^{45}, die, im Gegensatz zu jenen mit P^{32}, für Plasma und Urin gleiche spezifische Aktivitäten ergaben, abgelehnt.

Einige Nachuntersucher, so Friedländer u. Wilde an Ratten, Östling u. Tötterman am Menschen, bestätigten im Prinzip die Ergebnisse von Govaerts. Andere, wie Liljestrand u. Swedin, Henry, Jacobs u. Verbanck, registrierten bei Hunden keine oder nur geringe Unterschiede in der Ausscheidungsgeschwindigkeit von endogenem und exogenem Phosphat. Die belgischen Autoren arbeiteten bei anorganischen P-Spiegeln, die anfangs durch die Injektion von trägerhaltigem P^{32}

auf 6—10 mg%, d. h. auf das 2—4fache der Norm erhöht waren. Govaerts berichtete aber auch unter diesen Umständen (anorganische P-Spiegel bis 23 mg%) über eine bevorzugte Ausscheidung des exogenen P. Bei gleichzeitiger Zufuhr von trägerhaltigem P^{32} und Ca^{45}, d. h. bei erhöhten P- und Ca-Spiegeln, fand er allerdings die Ausscheidung des exogenen P im Vergleich zum endogenen verlangsamt. Wie sonst die verzögerte Ausscheidung des endogenen P auf dem Überwiegen der nichtfiltrierbaren P-Verbindung, soll in diesem Fall die verzögerte Ausscheidung des exogenen P auf dem Erscheinen des kolloidalen Ca-P-Komplexes beruhen.

Die größte Sicherheit, die Ausscheidungsgeschwindigkeit des endogenen P bei unverändertem physikalisch-chemischem Zustand mit der Ausscheidungsgeschwindigkeit des exogenen P vergleichen zu können, besteht bei Infusion von trägerfreier $H_3P^{32}O_4$. Wir führten 8 derartige Versuche an Katzen (Tab. 2A) und 2 weitere an Hunden durch. Das Verhältnis der Ausscheidungsgeschwindigkeiten von anorganischem P und P^{32} scheint danach für einzelne Tiere charakteristisch zu sein: Bei 3 Katzen überwog die Clearance der infundierten Aktivität, bei 2 weiteren, allerdings weniger deutlich, die Clearance des endogenen anorganischen P, während bei den 3 restlichen Tieren kein deutlicher Unterschied bestand. Bei einem Hund betrug das Verhältnis $\frac{\text{Clearance } P^{32}}{\text{Clearance anorg. (endog.) P}}$ 0,94, beim 2. nur 0,79 (Tab. 1C). Die Werte schwankten, ausgenommen Versuch 5 und 6 an Katzen, wo es schrittweise zum stärkeren Überwiegen der P^{32}-Clearance kam (vgl. Tab. 1A), beim selben Tier lediglich innerhalb der Fehlergrenzen dieses Quotienten. Die Ergebnisse waren unabhängig von Diurese, Höhe des anorganischen P-Spiegels und Infusionsdauer. In 2 Versuchen kam es nach Beendigung der $H_3P^{32}O_4$-Infusion zur relativen Abnahme der Clearance von P^{32} (vgl. Tab. 1A). In den anderen Fällen blieb das Verhältnis $\frac{\text{Clearance } P^{32}}{\text{Clearance anorg. (endog.) P}}$ bis zu 30 min nach Beendigung der P^{32}-Zufuhr konstant.

In 7 weiteren Versuchen wurde der anorganische P-Spiegel im Plasma durch zusätzliche Infusion von Trägerphosphat (Na_2HPO_4 und NaH_2PO_4 im Verhältnis 5:1) erhöht (vergl. Tab. 1B). Sie sollten zur Deutung der Versuche mit trägerhaltigem GlP^{32} dienen, wo ähnliche Steigerungen des anorganischen P-Spiegels vorkamen. Entsprechend Tab. 2B scheint der Quotient $\frac{\text{Clearance } P^{32}}{\text{Clearance endog. P}}$ bei Zufuhr trägerhaltiger $H_3P^{32}O_4$ im allgemeinen etwas kleiner zu sein als bei Zufuhr trägerfreier $H_3P^{32}O_4$.

B. Bei den *Versuchen mit trägerfreiem radioaktivem Glycerophosphat* war entsprechend Tab. 3A die Clearance der Aktivität mit einer Ausnahme kleiner als die von Creatinin, eine tubuläre Sekretion somit nicht nachweisbar. Im Gegensatz zu den Versuchen mit $H_3P^{32}O_4$ war jedoch die Clearance der Aktivität regelmäßig größer als die von anorganischem P (Quotient $\frac{\text{Clearance } P^{32}}{\text{Clearance anorg. P}}$ aus 24 Clearance-Perioden an 8 Tieren im

Mittel 1,51). Von Versuch zu Versuch bestanden auch hier deutliche Unterschiede. Dauerte die Infusion von GlP^{32} länger als 30 min, so nahm die Clearance der Aktivität im Vergleich zur Clearance von anorganischem P und von Creatinin im allgemeinen ab.

In einer 2. Versuchsreihe infundierten wir zuerst inaktives Glycerophosphat (Infusionsgeschwindigkeit 1—5 g/Std) und begannen 15 min später, nach der üblichen Anfangsinjektion, mit der zusätzlichen Infusion

Tabelle 2. *Versuche mit radioaktivem Orthophosphat.*

A. Versuche mit trägerfreier $H_3P^{32}O_4$.

$\frac{\text{Clearance } P^{32}}{\text{Clearance anorg. P}}$	$\frac{\text{Clearance } P^{32}}{\text{Clearance Creatinin}}$	anorg. Plasma-P mg%
0,84	—	3 —3,3
0,94	0,16	4 —4,1
1,06	0,25	3,9—4,2
1,04	0,18	4,6—3,7
1,28	—	3,8
1,54	0,18	5,3—5,6
0,84	0,13	2,8—3,9
1,13	—	4,5—4,8
Mittel 1,09	0,18	

B. Versuche mit trägerhaltiger $H_3P^{32}O_4$.

$\frac{\text{Clearance } P^{32}}{\text{Clearance anorg. P}}$	$\frac{\text{Clearance } P^{32}}{\text{Clearance endog. P}}$	$\frac{\text{Clearance } P^{32}}{\text{Clearance Creatinin}}$	anorg. Plasma-P mg%
0,91	0,6	0,31	5,2— 9,7
1,02	1,03	0,75	7 — 9,4
1,09	1,27	0,68	9 —16,0
0,96	0,89	0,43	8 —24,0
0,88	0,72	0,67	10 —20,0
0,98	0,91	0,39	9 —19,3
0,98	0,98	0,47	16 —24,0
Mittel 0,97	0,91	0,53	

Die einzelnen Werte stellen Mittel aus 3—7 Clearance-Perioden an einem Tier dar. Nähere Erläuterung siehe Text.

von GlP^{32}. Bei 3 Tieren wurde von diesem Zeitpunkt an auch noch Theophyllin zugeführt (vgl. Taugner u. Mitarb.). Entsprechend Tab. 3 B war bei dieser Versuchsanordnung die Clearance der Aktivität in 2 von 6 Versuchen größer als die Creatinin-Clearance, d. h., es kam zur tubulären Sekretion von P^{32} (vgl. Tab. 1 D). Auch die Ausscheidungsgeschwindigkeit von anorganischem P übertraf in einem Versuch deutlich die von Creatinin.

Die tubuläre Sekretion von P^{32} schien nach diesen Versuchen von der Infusion größerer Glycerophosphatmengen abzuhängen. Es war jedoch

fraglich, ob dabei die — durch enzymatische Spaltung von Glycerophosphat bedingte — Erhöhung des anorganischen oder des organischen P-Spiegels entscheidend ist. Wir infundierten daher, zur isolierten Erhöhung des ersteren, in einer dritten Versuchsreihe (Tab. 3C) zuerst inaktives Orthophosphat (Infusionsgeschwindigkeit 3—10 g/Std) und setzten 15 min später, nach einer Anfangsinjektion, der Infusionslösung

Tabelle 3. *Versuche mit radioaktivem Glycerophosphat.*

A. Versuche mit trägerfreier G P^{32}.

Clearance P^{32} / Clearance anorg. P	Clearance P^{32} / Clearance Creatinin	anorg. Plasma-P mg%
1,58	0,64	3,5—3,6
1,18	0,59	4,0—4,2
1,57	0,36	3,4—3,6
1,38	0,3	2,5—3,0
1,59	0,17	2,4
1,47	0,25	3,1
1,45	0,48	3,6—3,7
1,83	1,08	3,7—4,5
Mittel 1,51	0,48	

B. Versuche mit trägerhaltiger GlP^{32}.

Clearance P^{32} / Clearance anorg. P	Clearance P^{32} / Clearance Creatinin	Clearance anorg. P / Clearance Creatinin	Plasma-P mg% anorg.	org.
0,81	0,5	0,62	5,8— 7,2	8—25
0,93	0,54	0,59	6,4— 7,9	
1,04[1]	0,77	0,73	6,6— 8,9	
0,94[1]	1,15	1,24	7,8—10,5	
1,21[1]	1,25	1,04	8,0— 9,5	
1,28	1,07	0,84	11,6—15,3	
Mittel 1,04	0,88	0,84		

C. Versuche mit trägerfreier GlP^{32} und zusätzlicher Infusion von inaktivem Orthophosphat.

Clearance P^{32} / Clearance anorg. P	Clearance P^{32} / Clearance Creatinin	Clearance anorg. P / Clearance Creatinin	anorg. Plasma-P mg%
1,36	0,73	0,54	22—23
1,39	0,75	0,54	22—27
0,96	0,59	0,62	23—30
0,92	0,6	0,65	41—54
0,94	0,59	0,63	61—73
Mittel 1,11	0,65	0,59	

Die einzelnen Werte stellen Mittel aus je 3 Clearance-Perioden an einem Tier dar.

[1] Zusätzliche Infusion von Theophyllin (50—60 mg/Std). Nähere Erläuterung im Text.

auch noch trägerfreies GlP^{32} zu. Der Quotient $\frac{\text{Clearance } P^{32}}{\text{Clearance Creatinin}}$ stieg bei diesem Vorgehen trotz extremer Erhöhung des anorganischen P-Spiegels nur auf Werte zwischen 0,59 und 0,75 an. Damit schien erwiesen, daß die erhöhte P^{32}-Clearance nach GlP^{32}-Infusion vom Glycerophosphatspiegel selbst abhängt. Es blieb jedoch ungewiß, ob dieses Glycerophosphat die Ausscheidung der noch als GlP^{32} oder die Ausscheidung der schon als anorganisches P^{32} im Plasma vorhandenen Aktivität erhöht. Wir infundierten daher in zwei Versuchen trägerfreie $H_3P^{32}O_4$ zusammen mit inaktivem Glycerophosphat (5 g/Std). Der Quotient $\frac{\text{Clearance } P^{32}}{\text{Clearance Creatinin}}$ wurde dabei nicht weiter vergrößert, als durch entsprechende Erhöhung des anorganischen P-Spiegels in den Versuchen mit trägerhaltiger $H_3P^{32}O_4$ (vgl. Tab. 2). Der erhöhte Glycerophosphatspiegel scheint demnach die Ausscheidung der noch als GlP^{32} selbst zur Niere gelangenden Aktivität und weniger die von anorganischem P^{32} zu beeinflussen.

Diskussion.

A. Bei Verwendung von trägerfreiem radioaktivem Orthophosphat kam es nur an 3 von 8 Katzen, in Übereinstimmung mit den Versuchen von J. Govaerts an Hunden, zum Überwiegen der exogenen P-Clearance. Bei 2 Katzen und einem Hund war jedoch die Clearance des endogenen P größer. Bei 3 Katzen und einem weiteren Hund registrierten wir gleiche Ausscheidungsgeschwindigkeiten. Während von Jacobs u. Mitarb. bei Infusion trägerhaltiger $H_3P^{32}O_4$ an Hunden ein geringes, von J. Govaerts auch dabei ein deutliches Überwiegen der exogenen P-Ausscheidung registriert wurde, überwog bei Erhöhung des anorganischen P-Spiegels nur an einer unserer 7 Katzen die Ausscheidung des exogenen P. In 2 Fällen war das Ergebnis auch hier umgekehrt. Ähnliches gilt von 2 Versuchen an Hunden.

Diese Ergebnisse würden bedeuten, daß in einigen Fällen die Filtrierbarkeit des exogenen, in anderen die Filtrierbarkeit des endogenen P überwiegen kann. Auch gleiche Filtrierbarkeit scheint vorzukommen. Derartige Schlüsse sind jedoch nicht ohne weiteres erlaubt, da verschiedene, im folgenden besprochene Fehlerquellen den Vergleich der tatsächlichen Ausscheidungsgeschwindigkeiten von exogenem und endogenem P erschweren (vgl. Jacobs u. Mitarb.).

a) In den Quotienten Clearance P^{32} : Clearance anorg. (endog.) P gehen bei Verwendung trägerfreier Aktivität 2 chemische Analysen und 2 Bestimmungen der Radioaktivität mit einem Fehler von je $\pm 2{,}5\%$ ein. Dadurch kann eine Verfälschung der Werte um etwa 10% zustande kommen. Systematische Abweichungen von 1,0, die auf ein Überwiegen der exogenen oder endogenen P-Ausscheidung hindeuten, sind dadurch jedoch nicht zu erklären. Der Fehler des Quotienten Clearance P^{32} : Clearance endogenes P wird in den Versuchen mit trägerhaltiger

$H_3P^{32}O_4$ durch die Subtraktion des exogenen vom gesamten anorganischen P noch weiter, und zwar auf etwa 15% erhöht.

b) Der tote Raum kann nur annäherungsweise bestimmt werden und stellt bei raschen Veränderungen des Plasmaspiegels und kleiner Diurese eine beachtliche Fehlerquelle dar. Wir versuchten Anfangsinjektion und anschließende Infusion von P^{32} so aufeinander abzustimmen, daß der Aktivitätsspiegel langsam anstieg. Da der tote Raum bei den gemessenen Harnmengen in 2—4 min leergespült und außerdem in Korrekturen berücksichtigt wurde, dürften die Ergebnisse bei fortdauernder Infusion auch durch ihn nicht wesentlich verfälscht sein.

c) Jacobs u. Mitarb. wiesen darauf hin, daß es nach der Blutentnahme zwischen Plasma und Erythrocyten zum Austausch von P und so, durch Abnahme der spezifischen Plasmaaktivität, zur scheinbaren Vergrößerung der P^{32}-Clearance kommen kann. Den Angaben von Hevesy u. Zerahn zufolge würde jedoch dieser Fehler selbst bei ungekühltem Blut die registrierten Abweichungen des Quotienten Clearance P^{32} : Clearance anorg. (endog.) P nicht erklären.

d) Die aus den Analysenwerten nach Fiske u. Subbarow errechnete Clearance stellt vielleicht nicht die wahre Clearance des anorganischen P dar. Diese könnte scheinbar verkleinert werden, wenn das Plasma, wie von Jacobs u. Mitarb. diskutiert, labile organische Phosphate enthält, die schlechter filtriert werden als das anorganische P (vgl. Elliott, Hahn u. Hevesy). Diese Phosphatfraktion müßte jedoch erst mit modernen chromatographischen Methoden nachgewiesen werden. Für gut filtrierbare organische Phosphate sollten nach unseren Ergebnissen mit Hexose- und Triosephosphat eher größere Ausscheidungsgeschwindigkeiten angenommen werden: Die Clearance von anorganischem P kann nach Taugner u. Mitarb. sogar scheinbar vergrößert werden durch anorganisches Urinphosphat, das erst während der Nierenpassage aus P-Estern abgespalten wird. Diese Möglichkeit verliert jedoch durch die vorliegenden Ergebnisse mit GlP^{32} bei normalen P-Spiegeln an Bedeutung.

e) Bei Versuchen mit trägerhaltiger $H_3P^{32}O_4$ sind Veränderungen im ursprünglichen physikalisch-chemischen Zustand des Plasma-P möglich.

f) Es könnte sein, daß infundiertes radioaktives Orthophosphat sich dem endogenen anorganischen P angleicht bzw. in organische P-Verbindungen eingebaut wird. Die Clearance von P^{32} würde dann nicht mehr der ursprünglichen Definition als exogener P-Clearance entsprechen. Bemerkenswert erscheint jedoch, daß der Quotient Clearance P^{32} · Clearance anorg. P innerhalb unserer einzelnen Versuche mit trägerfreier $H_3P^{32}O_4$ weitgehend konstant blieb.

g) Es ist mit modifizierenden Einflüssen der bei Katzen allerdings unvermeidbaren Narkose zu rechnen.

Es scheint nach dieser Aufzählung wohl fraglich, ob man aus unseren Ergebnissen auf Unterschiede in der Filtrierbarkeit des exogenen im Vergleich zum endogenen anorganischen P schließen darf. Zunächst müßte wohl die Auswirkung der zahlreichen Fehlerquellen, wie von J. Govaerts für den toten Raum der Nieren angestrebt, ausgeschlossen werden.

B. Bei Zufuhr von radioaktivem Glycerophosphat setzt sich die Clearance der Aktivität zusammen aus der Clearance von GlP^{32} sowie aus der Clearance von anorganischem P^{32}, das durch enzymatische Spaltung im Plasma erscheint. Eine Abtrennung beider war mit unseren Methoden nicht möglich. Die Versuche mit radioaktivem Orthophosphat

sollten daher vor allem der Feststellung dienen, ob die in den Versuchen mit GlP^{32} erwartete Annäherung der Aktivitäts-Clearance an die Clearance von Creatinin durch die im Vergleich zum endogenen anorganischen P erhöhte Filtrierbarkeit des exogenen P bedingt sein kann. Da das Verhältnis $\frac{\text{Clearance } P^{32}}{\text{Clearance Creatinin}}$ bei Infusion trägerfreier $H_3P^{32}O_4$ im Mittel nur 0,18, bei GlP^{32} dagegen 0,48 betrug, ist dies in den Versuchen mit trägerfreier Aktivität sicher nicht der Fall. Die Clearance von P^{32} erreichte jedoch nur in einem Versuch die von Creatinin, d. h., eine nachweisbare tubuläre Sekretion kam bei Zufuhr von trägerfreiem GlP^{32} nicht vor. Dieser Befund spricht zwar gegen die frühere Annahme, daß die Clearance von anorganischem P bei normalen organischen P-Spiegeln durch die tubuläre Sekretion aus P-Estern modifiziert werden könne. Einzelne Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, daß die Verhältnisse durch noch unbekannte Faktoren kompliziert werden können.

Auch bei Infusion von trägerhaltigem GlP^{32} war — beurteilt nach den Versuchen mit trägerhaltiger $H_3P^{32}O_4$ — die weitgehende Annäherung der Clearance von P^{32} an die Creatinin-Clearance nicht durch die vermehrte Filtrierbarkeit des anorganischen P bedingt. Die Creatinin-Clearance wurde hier, wie in früheren Versuchen mit nichtmarkierten P-Estern, sogar bei 2 Tieren deutlich von der P^{32}-Clearance übertroffen. Die tubuläre P-Sekretion kann demnach nur bei Erhöhung des P-Angebots manifest werden. Ergänzende Versuche, nach denen Glycerophosphat die Ausscheidung von anorganischem P^{32} und anorganisches Phosphat die von GlP^{32} nicht in spezifischer Weise beeinflußt, deuten darauf hin, daß dabei die Erhöhung des Glycerophosphatspiegels entscheidend ist. Bei niedrigen Esterspiegeln wird die tubuläre Sekretion — in Analogie zu den Verhältnissen bei der Kaliumausscheidung — möglicherweise von der P-Rückresorption überlagert.

Nach den vorliegenden Ergebnissen scheint — bei normalen Esterspiegeln — die tubuläre P-Sekretion an der P-Ausscheidung sowie an der Säure-Basen-Regulation nicht maßgeblich beteiligt zu sein.

Zusammenfassung.

Nach früheren Versuchen kann es bei Zufuhr größerer Mengen von Glycerophosphat, Phosphoglycerinsäure oder Hexosediphosphat zur tubulären Sekretion von anorganischem Phosphat und Esterphosphat kommen. Die vorliegenden Ergebnisse beweisen indessen, daß dieser Effekt von der Erhöhung des P-Esterspiegels im Plasma abhängt. Bei niedrigen Glycerophosphatspiegeln ist eine tubuläre Sekretion nicht nachweisbar, vielleicht wird sie hier — in Analogie zu den Verhältnissen bei der Kaliumausscheidung — von der P-Rückresorption überlagert.

Bestimmte Zusammenhänge zwischen der Ausscheidung von anorganischem und organischem P waren der Anlaß, in vergleichenden Versuchen auch radioaktives Orthophosphat zu verwenden. Diese Versuche sollten vor allem zur Beurteilung der Filtrierbarkeit des exogenen im Vergleich zum endogenen anorganischen P dienen. Die registrierten Unterschiede in der Ausscheidungsgeschwindigkeit waren jedoch nicht mit Sicherheit von den Einflüssen einzelner, ausführlich diskutierter Fehlerquellen abzutrennen.

Literatur.

Eggleton, M. G., and Y. A. Habib: Urinary excretion of phosphate in man and the cat. J. of Physiol. **111**, 423 (1950). — Eichholtz, F., and E. H. Starling: The action of inorganic salts on the secretion of the isolated kidney. Proc. Roy. Soc. Lond. B **98**, 93 (1925). — Elliott, C., L. Hahn u. G. Hevesy: Acta physiol. scand. (Stockh.) **16**, 20 (1948). — Fiske, C. H., and Y. Subbarow: The colorimetric determination of phosphorus. J. of Biol. Chem. **66**, 376 (1925). — Friedländer, H. D., and W. S. Wilde: Testing blood plasma to tissue exchange rate by urine isotope ratio: inorganic phosphate. Amer. J. Physiol. **164**, 159 (1951). — Govaerts, J.: Étude de l'état physico-chimique de l ion phosphorique dans le plasma a l'aide du radiophosphore $^{15}_{32}$P en rapport avec le seuil de l'élimination urinaire de l'ion phosphorique. Arch. internat. Pharmacodynamie **75**, 261 (1948). — État physico-chimique des ions PO_4 et Ca dans le plasma étudié en utilisant simultanément le ^{32}P et le ^{45}Ca. Validité de la méthode des indicateurs isotopiques. Arch. internat. Physiol. **110**, fasc. 3 (1952). — Handler, Ph., and D. V. Cohn: Use of radiophosphorus in studies of glomerular permeability of plasma inorganic phosphate. Amer. J. Physiol. **164**, 648 (1951). — Henry, J. A., E. Jacobs and M. Verbanck: Study of renal permeability to plasma inorganic phosphorus by means of P^{32}. Arch. internat. Pharmacodynamie **94**, 235 (1953). — Hevesy, G., and K. Zerahn: Determination of the red corpuscle content. Acta physiol. scand. (Stockh.) **4**, 376 (1942). — Jacobs, E., M. Verbanck and J. A. Henry: Comparative study of kidney permeability to plasma „inorganic" phosphorus and to an injected inorganic phosphate: effect of parathyreoid hormone on the renal filtrability of plasma inorganic phosphorus. Arch. internat. Pharmacodynamie **95**, 321 (1953). — Lieb, H., u. M. K. Zacherl: Untersuchungen über den Kreatin- und Kreatininstoffwechsel. I. Mitteilung. Zur Methodik der Kreatininbestimmung in Harn und Blut. Z. physiol. Chem. **223**, 169 (1934). — Liljestrand, A., and B. Swedin: The urinary excretion of phosphate in the dog. Acta physiol. scand. (Stockh.) **25**, 168 (1952). — Östling, G., and G. Tötterman: Specific activity of inorganic phosphorus in plasma and urine during constant infusion of radioactive phosphate in man. Arch. internat. Pharmacodynamie **92**, 362 (1952). — Pitts, R. F., and R. S. Alexander: The renal reabsorbtive mechanism for inorganic phosphate in normal and acidotic dogs. Amer. J. Physiol. **142**, 648 (1944). — Taugner, R., M. v. Bubnoff u. W. Braun: Gibt es eine tutuläre Phosphatsekretion? Über die Ausscheidung von anorganischem und organischem Phosphat bei der Katze. Pflügers Arch. **258**, 133 (1953).

Dr. E. Schmid, Heidelberg, Pharmakol. Inst. d. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 224, S. 465—475 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. F. Eichholtz).

Über das Verhalten von Adenosintriphosphat, Adenosindiphosphat und anderen Phosphorsäure-Estern bei der Kontraktur des Froschrectus durch Acetylcholin, Nicotin und Succinylbischolin*.

Von
A. Fleckenstein, J. Janke, R. Kruse und G. Lechner**.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 21. Oktober 1954.)

In vorausgegangenen Untersuchungen am Froschrectus hat sich ergeben, daß die Kontrakturwirkung zahlreicher Pharmaka (Acetylcholin, Cholin, Neurin, Nicotin, Coniin, Veratrin, KCl, RbCl, Decamethonium) auf einer reversiblen Depolarisation der Muskelfasern beruht (vgl. Fleckenstein u. Mitarb. 1—3). Es kann daher eine sofortige Erschlaffung erzwungen werden, wenn man die Fasern mittels einer Gleichstromanode repolarisiert (Fleckenstein, Hille u. Adam; Fleckenstein u. Richter). Die kontrahierten Fasern strecken sich dann — selbst in stark konzentrierten Lösungen der genannten Kontrakturstoffe — wieder in die Länge. Auch die durch Succinylbischolin, Adipinbischolin, Benzoylcholin erzeugten Kontrakturen lassen sich in dieser Weise durch die Anode neutralisieren. Der Zustand des contractilen Mechanismus hängt also offensichtlich von der elektrischen Aufladung der Grenzflächen ab: Die Muskelfasern sind jeweils voll verlängert, wenn sie ihr volles Ruhepotential besitzen. Bei Entladung der Membranen durch den Kontrakturstoff gehen sie in den verkürzten Zustand über. Erschlaffung tritt ein, wenn sich das Membranpotential regeneriert bzw. durch anodische Polarisation restituiert wird.

Wenig klar ist bisher, ob sich hinter diesen Potentialveränderungen Konzentrationsänderungen von Adenosintriphosphat (ATP) und Adenosindiphosphat (ADP) verbergen. *Nach einer weit verbreiteten Vorstellung sollen nämlich Kontraktion und Kontraktur — ebenso wie die Absterbe-Verkürzung — durch einen Abfall des ATP-Gehaltes in den Muskelfasern verursacht sein. Die Erschlaffung soll dann infolge Wiederauffüllung des ATP-Speichers eintreten* (vgl. Bendall). Eine ähnliche Auffassung wurde

* Eine vorläufige Mitteilung ist am 5. Okt. 1954 (21. Tagg. der Dtsch. Pharmakol. Ges. in Saarbrücken) durch Frl. Dr. J. Janke erfolgt.

** Herrn Prof. Dr. F. Eichholtz zum 65. Geburtstag gewidmet.

neuerdings von Lorand auf Grund von Versuchen an wasser-glycerin-extrahierten Muskeln entwickelt: Während der Verkürzung soll ATP an Actomyosin gebunden sein und dabei dephosphoryliert werden, die Erschlaffung soll dann während der ATP-Resynthese aus Kreatinphosphat nach folgender Reaktion vor sich gehen:

$$\text{Kreatinphosphat} + \underset{\text{(verkürzt)}}{\text{ADP-Actomyosin}} \xrightarrow{\text{Transphosphorylase}} \text{Kreatin} + \underset{\text{(verlängert)}}{\text{ATP-Actomyosin}}$$

Eine kürzlich von Szent-Györgyi gegebene Version der ATP-Theorie postuliert den gleichen Mechanismus. Alle diese Hypothesen vertreten einen „Kontraktionscyclus" mit ATP-Spaltung bei der Verkürzung und ATP-Resynthese aus Kreatinphosphat bei der Wiederverlängerung.

Eine experimentelle Fundierung dieser Vorstellungen am lebenden Muskel ist bisher nicht erfolgt. Eigene Untersuchungen am M. rectus des Frosches haben vielmehr ergeben, daß während der KCl-Kontraktur, Coffeinkontraktur (bei 0° C) und im Tetanus keine Verschiebung der ATP und ADP-Werte eintreten, die der Verkürzung oder Erschlaffung parallel laufen (Fleckenstein u. Janke; Fleckenstein, Janke, Elke; Fleckenstein, Janke, Lechner u. Bauer). In den hier beschriebenen Experimenten sollten diese Befunde — unter Verwendung der reversibel depolarisierenden Kontrakturstoffe Acetylcholin, Nicotin und Succinylbischolin — erweitert werden. ATP und ADP wurden wieder auf papierchromatographischem Wege getrennt und dann separat bestimmt.

Experimenteller Teil.

Bei den Experimenten kamen paarige, isolierte M. recti von frisch gefangenen Temporarien und Eskulenten zur Verwendung (Sommertiere). Am oberen Ende der Muskeln verblieb jeweils ein kleines Stück Sternum, an das untere, sehnige Ende wurde eine kleine Fadenschlinge gelegt. Nach Wägung und 10—15 min Aufenthalt in Frosch-Ringer-Lösung wurden die Muskeln dann an einem isotonischen Hebel befestigt (Belastung 8,5 g) und für weitere 5 min in sauerstoffdurchperlter Ringer-Lösung belassen. Zur Befestigung am oberen Ende diente ein durch das Sternum gestochener Haken, unten die angelegte Fadenschlinge. Der eine M. rectus wurde in die kontrakturerzeugenden Lösungen (Frosch-Ringer-Lösung + Kontrakturstoff) eingetaucht und die dabei eintretende Verkürzung an einem Kymographion registriert.

In 3 verschiedenen Versuchsreihen kam zur Anwendung:

a) eine Acetylcholin-Ringer-Lösung 1 : 10000 bei 0° C für 90 sec,
b) eine Nicotin-Ringer-Lösung 1 : 2500 bei 20° C für 60 sec,
c) eine Succinylbischolin-Ringer-Lösung 1 : 5000 bei 20° C für 60 sec.

Die Muskeln wurden dann nach Ablauf der Einwirkungszeit des Kontrakturstoffes durch rasches Anheben eines Dewar-Gefäßes in flüssigen Stickstoff (— 195,8° C) versenkt und so in verkürztem Zustand fixiert. Nach 1—2 min wurden die hart gefrorenen Muskeln durch Scherenschlag von ihrer unteren Befestigung sowie vom Sternumrest abgetrennt und vor dem Pulverisieren in einem kleinen Mörser nochmals reichlich mit flüssigem Stickstoff übergossen. Fadenbefestigung und Sternumrest wurden dann zurückgewogen.

Auf die Kontrollmuskeln (jeweils abwechselnd re. oder li. M. rectus) wirkte anstatt der kontrakturerzeugenden Lösungen eine reine Frosch-Ringer-Lösung ein. Die übrige Behandlung der Kontrollmuskeln war mit der Behandlung der Kontrakturmuskeln identisch. Die Kontrollmuskeln wurden jedoch — jeweils 1 min vor dem Eintauchen in flüssigen Stickstoff — in allen Versuchsreihen auf 0° C gekühlt. Das Auftreten von stärkeren „Kältekontrakturen" beim Eintauchen in den flüssigen Stickstoff läßt sich auf diese Weise beim Eskulenten-Rectus meist vermeiden. Der dünne Rectus von weiblichen Temporarien zeigte nach Vorkühlung auf 0° C beim Eintauchen in flüssigen Stickstoff niemals eine „Kältekontraktion".

Die im Mörser pulverisierten Muskeln wurden anschließend für 3 min mit 2 ml 5%iger Trichloressigsäure von 0° C extrahiert. Nach Abtrennung der Muskelbestandteile durch Zentrifugieren in der Kälte wurden die überstehenden „Muskelextrakte" sofort bei — 18° C in einer Tiefkühltruhe eingefroren.

Die papierchromatographische Aufarbeitung der Extrakte erfolgte nach unserem — auf der Basis der Methode von Eggleston und Hems — entwickelten Verfahren (vgl. Fleckenstein u. Janke; Fleckenstein, Janke, Lechner u. Bauer). Hierbei kommen nacheinander 2 Lösungsmittel zur Anwendung. Nach der erfolgten Trennung wurden die P-haltigen Areale ausgeschnitten, feucht verascht und ihr P-Gehalt nach Berenblum und Chain elektrophotometrisch bestimmt.

Ausgehend von etwa 1,5 ml Muskelextrakt wurden folgende Fraktionen jeweils in Doppelbestimmungen analysiert.

1. der säurelösliche Gesamtphosphor in 50 mm^3 des Extraktes,

2. der Kreatin-P nach der Methode von Eggleton u. Eggleton. Hierzu wurde jeweils 0,5 ml Trichloressigsäure-Extrakt sofort nach dem Abzentrifugieren der Muskelbestandteile abgezweigt und mit Bariumhydroxyd gegen Phenolphthalein neutralisiert.

3. die Gesamtfraktion anorganischer P + Kreatin-P,

4. der organische Gesamt-P ohne Kreatin-P,

5. ATP,

6. ADP,

7. die „Dritte Fraktion". Die Identität dieser „Dritten Fraktion" (vgl. Fleckenstein u. Janke) ist bis jetzt nicht geklärt. Die Fraktionen 3. und 4. wurden nach papierchromatographischer Trennung durch das I. Lösungsmittel bestimmt, die Fraktionen 5., 6. und 7. nach papierchromatographischer Trennung durch das I. und II. Lösungsmittel. Die gewonnenen Werte sind im folgenden jeweils in doppelter Weise wiedergegeben, a) absolut in μmol/g frischer Muskel, b) relativ als prozentualer Anteil am säurelöslichen Gesamtphosphor.

Ergebnisse.

ATP und ADP können nach dem Photoprintverfahren von Markham u. Smith mit UV-Licht (Wellenlänge 260 mμ) im Chromatogramm sichtbar gemacht werden. UV-Aufnahmen von Muskelextrakten zeigen nach Anwendung der beiden Lösungsmittel einen dicken UV-absorbierenden Fleck (UV-Fleck A_1 = ATP) und einen schwächeren Fleck (UV-Fleck A_2 = ADP). In Abb. 1 sind als Beispiele die UV-Bilder der Chromatogramme von 3 verschiedenen Rectuspaaren wiedergegeben. Der eine Muskel war dabei jeweils mit Acetylcholin, Nicotin bzw. Succinylbischolin in eine stärkere Kontraktur versetzt und so eingefroren

worden, während der Kontrollmuskel jeweils im verlängerten Ruhezustand erstarrte. Die Abbildungen lassen bei den verkürzten Muskeln keine Abnahme von ATP und keine Zunahme von ADP erkennen. Die chemischen Analysenergebnisse für ATP und ADP sowie für die anderen Fraktionen sind in Tab. 1—3 zusammengestellt. *Tatsächlich zeigen die Muskeln im Zustand der Kontraktur durch Acetylcholin, Nicotin bzw.*

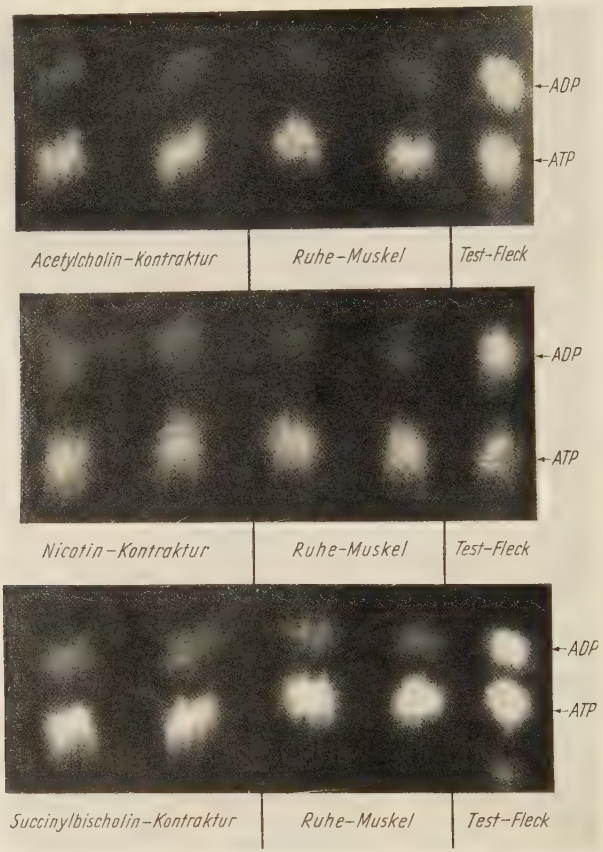


Abb. 1. UV-Bilder der Chromatogramme von 3 Muskelpaaren (M. rectus abdom. von R. esculenta) nach Anwendung des I. u. II. Lösungsmittels. Der dicke UV-absorbierende Fleck ist ATP, der schwächere Fleck darüber ist ADP. Der rechte M. rectus wurde im Ruhezustand in flüssigem Stickstoff eingefroren, der linke M. rectus wurde auf dem Gipfel der Kontraktur (Acetylcholin, Nicotin, Succinylbischolin) in flüssigen Stickstoff versenkt. Die Chromatogramme wurden als Duplikat angelegt. Die kontrahierten M. recti lassen keine Verschiebung der ATP- und ADP-Fraktionen gegenüber den erschlafften Kontrollmuskeln erkennen.

Succinylbischolin jeweils etwa den gleichen ATP und ADP-Gehalt, wie die verlängerten Kontrollmuskeln. Auch der prozentuale Anteil des ATP-Phosphors und ADP-Phosphors am säurelöslichen Gesamt-P veränderte

Tabelle 1. *Acetylcholinkontraktur des Temporarien- bzw. Eskulentenrectus von 90 sec Dauer bei 0° C.* (Acetylcholin-RINGER-Lösung 1 : 10000).

Versuchs-Nr.		Frisch-gewicht mg	ATP		ADP		ATP / ADP	Kreatin-P		„Dritte Fraktion"		Organischer Gesamt-P		Anorgan. P Kreatin-P		Org. Gesamt-P / Anorg. P + Kreatin-P	Arbeit cm/g
			µmol/g	%	µmol/g	%		µmol/g	%	µmol P/g	%	µmol P/g	%	µmol P/g	%		
D_1	Kontrahiert	142	2,806	26,28	0,608	3,79	4,62	8,175	25,52	0,900	2,81	14,58	45,52	17,42	54,48	0,836	132
T	Ruhemuskel	158	2,669	24,16	0,593	3,58	4,50	9,47	28,67	1,232	3,72	16,32	49,27	16,81	50,73	0,971	—
D_2	Kontrahiert	103	1,976	22,98	0,542	4,21	3,64	6,78	26,30	0,691	2,68	11,17	43,34	14,61	56,66	0,764	113
T	Ruhemuskel	102	2,279	21,71	0,565	3,59	4,03	9,106	28,92	1,661	5,27	14,54	46,21	16,93	53,79	0,859	—
D_3	Kontrahiert	120	2,105	20,43	0,712	4,61	2,96		—	0,740	2,39	14,70	47,55	16,25	52,45	0,908	108
T	Ruhemuskel	118	1,750	21,75	0,523	4,34	3,34	8,43	34,92	0,809	3,35	12,26	50,70	11,91	49,30	1,028	
D_4	Kontrahiert	184	2,285	24,48	0,482	3,44	4,73	6,24	22,28	0,525	1,87	13,60	48,62	14,39	51,38	0,948	86
T	Ruhemuskel	180	1,995	21,58	0,513	3,70	3,89	10,90	39,35	0,672	2,43	13,47	48,66	14,22	51,34	0,948	—
D_5	Kontrahiert	95	2,250	25,55	0,894	6,76	2,53	7,41	28,05	1,565	5,93	12,63	47,83	13,75	52,17	0,919	165
T	Ruhemuskel	107	2,240	24,72	0,860	6,32	2,60	9,73	35,75	1,396	5,14	13,17	48,40	14,04	51,60	0,936	—
D_6	Kontrahiert	105	2,270	20,08	0,680	4,16	3,34	5,63	17,18	1,164	3,55	14,25	43,46	18,57	56,54	0,768	107
T	Ruhemuskel	109	2,133	23,54	0,574	4,23	3,72	7,49	27,55	1,368	5,03	12,64	46,51	14,64	53,49	0,864	—
Mittelwert: Kontrahiert			2,28	23,30	0,65	4,49	3,64	6,85	23,86	0,93	3,20	13,48	46,05	17,49	53,94	0,857	118
Mittelwert: Ruhemuskel			2,18	22,91	0,60	4,29	3,68	9,19	32,52	1,19	4,16	13,73	48,29	14,75	51,70	0,934	—

Tabelle 2. *Nicotinkontraktur des Eskulentenrectus von 60 sec Dauer bei 20° C.*
(Nicotin-Ringer-Lösung 1 : 2500).

Versuchs-Nr.		Frisch-gewicht mg	ATP		ADP		ATP / ADP	Kreatin-P		„Dritte Fraktion"		Organischer Gesamt-P		Anorgan. P - Kreatin-P		Org. Gesamt-P / Anorg. P + Kreatin-P	Arbeit gm/g
			µmol/g	%	µmol/g	%		µmol/g	%	µmol P/g	%	µmol P/g	%	µmol P/g	%		
D_7	Kontrahiert	153	2,12	23,10	0,528	3,84	4,02	7,81	28,35	0,714	2,59	11,03	40,05	16,51	59,95	0,668	79
	Ruhemuskel	146	2,45	22,77	0,586	3,64	4,18	13,18	40,85	1,628	5,04	13,71	42,54	18,52	57,46	0,741	—
D_8	Kontrahiert	122	2,45	23,25	0,873	5,53	2,81	5,22	16,50	0,994	3,14	13,71	43,37	17,91	56,63	0,766	59
	Ruhemuskel	121	2,54	24,43	0,691	4,43	3,67	10,53	33,79	1,240	3,97	13,98	44,78	17,23	55,22	0,811	–
D_9	Kontrahiert	171	1,99	20,55	0,612	4,21	3,25	6,88	23,70	0,852	2,93	9,47	32,67	19,55	67,33	0,484	76
	Ruhemuskel	172	2,23	19,46	0,779	4,54	2,86	10,38	30,21	1,240	3,62	12,85	37,41	21,49	62,59	0,598	—
D_{11}	Kontrahiert	180	2,36	23,80	0,822	5,62	2,87	8,13	27,35	0,880	2,95	12,11	40,78	17,61	59,22	0,688	65
	Ruhemuskel	179	2,42	21,07	0,933	5,41	2,59	11,50	33,39	1,361	3,95	13,97	40,50	20,52	59,50	0,681	—
D_{12}	Kontrahiert	184	1,955	17,70	0,957	5,76	2,04	1,99	6,00	0,846	2,55	13,20	39,75	20,00	60,25	0,660	46
	Ruhemuskel	172	1,994	20,55	0,823	5,65	2,42	10,43	35,88	0,864	2,97	12,90	44,46	16,17	55,54	0,799	—
D_{13}	Kontrahiert	128	1,925	20,35	0,595	4,19	3,24	6,49	22,85	0,653	2,31	10,61	37,43	17,74	62,57	0,598	47
	Ruhemuskel	120	1,935	20,75	0,576	4,12	3,36	9,41	33,59	0,588	2,10	10,30	36,79	17,67	63,21	0,583	
Mittelwert: Kontrahiert			2,13	21,46	0,73	4,86	3,04	6,09	20,79	0,82	2,74	11,69	39,01	18,22	60,99	0,644	62
Mittelwert: Ruhemuskel			2,26	21,50	0,73	4,63	3,18	10,90	34,62	1,15	3,61	12,95	41,08	18,60	58,96	0,702	—

Tabelle 3. *Succinylbischolinkontraktur des Eskulentenrectus von 60 sec Dauer bei 20° C.*
(Succinylbischolin-RINGER-Lösung 1 : 5000).

Versuchs-Nr.		Frisch-gewicht mg	ATP		ADP		ATP / ADP	Kreatin-P		„Dritte Fraktion"		Organischer Gesamt-P		Anorgan. P + Kreatin-P		Org. Gesamt-P / Anorg. P + Kreatin-P	Arbeit gcm/g
			µmol/g	%	µmol/g	%		µmol/g	%	µmol P/g	%	µmol P/g	%	µmol P/g	%		
D_{14}	Kontrahiert	188	2,68	22,35	0,840	4,66	3,19	7,66	21,30	0,895	2,48	13,81	38,43	22,10	61,57	0,625	77
	Ruhemuskel	188	2,62	21,85	0,785	4,36	3,34	13,63	37,95	1,010	2,81	14,00	38,92	21,99	61,08	0,637	—
D_{15}	Kontrahiert	123	3,09	24,25	1,050	5,50	2,94	10,13	26,50	1,225	3,21	14,43	37,79	23,75	62,21	0,607	78
	Ruhemuskel	147	3,12	25,10	0,924	4,96	3,38	11,96	32,15	1,365	3,67	14,13	37,95	23,10	62,05	0,612	—
D_{16}	Kontrahiert	150	2,92	25,15	1,123	6,44	2,60	8,68	24,95	0,819	2,35	16,28	46,67	18,58	53,33	0,875	31
	Ruhemuskel	146	3,03	26,95	1,030	5,88	2,95	13,88	39,70	0,976	2,79	15,82	45,21	19,20	54,79	0,825	—
D_{17}	Kontrahiert	154	2,68	26,22	0,894	5,82	3,01	9,92	32,30	0,740	2,41	13,49	43,91	17,22	56,09	0,782	76
	Ruhemuskel	141	2,93	25,85	0,980	5,76	2,99	10,43	30,70	0,947	2,78	14,59	42,93	19,40	57,07	0,752	.
D_{18}	Kontrahiert	102	2,44	23,02	1,286	8,08	1,89	7,05	22,15	1,018	3,20	13,05	41,07	18,75	58,93	0,697	61
	Ruhemuskel	98	2,25	22,70	1,260	8,46	1,78	10,91	36,60	1,145	3,84	12,68	42,53	17,14	57,47	0,739	—
D_{19}	Kontrahiert	157	2,84	22,20	1,105	5,75	2,57	8,32	21,69	0,864	2,25	16,48	42,94	21,90	57,06	0,752	71
	Ruhemuskel	175	3,01	23,01	1,121	5,72	2,68	16,09	41,00	1,573	4,02	16,69	42,48	22,59	57,52	0,738	—
Mittelwert: Kontrahiert			2,78	23,87	1,05	6,04	2,70	8,63	24,81	0,93	2,65	14,59	41,80	20,38	58,20	0,723	65,6
Mittelwert: Ruhemuskel			2,83	24,09	1,02	5,86	2,85	12,81	36,35	1,17	3,32	14,65	41,67	20,57	58,33	0,717	—

sich praktisch nicht[1]. *Dagegen nahm Kreatinphosphat in den Kontrakturmuskeln regelmäßig ab.* Bei 6 Versuchen mit Acetylcholin (90 sec Einwirkung bei 0° C) wurde im Mittel ein Rückgang von 9,19 μmol Kreatinphosphat/g Muskel auf 6,85 μmol/g gefunden. (Differenz 2,34 μmol/g). In den 6 Nicotinversuchen (60 sec Einwirkung bei 20° C) sank der Kreatinphosphatgehalt im Mittel von 10,90 auf 6,09 μmol/g (Differenz 4,81 μmol/g). Auch Succinylbischolin (60 sec Einwirkung bei 20° C) setzte den Kreatinphosphatgehalt im Mittel aus 6 Experimenten von 12,81 μmol/g auf 8,63 μmol/g herab (Differenz 4,18 μmol/g). Die noch nicht identifizierte „Dritte Fraktion" ging in 16 von 18 kontrahierten Muskeln ebenfalls zurück. In der Acetylcholinserie betrug die mittlere Abnahme 0,26 μmol P/g, in der Nicotinserie 0,33 μmol P/g, in der Succinylbischolinserie 0,24 μmol P/g.

Ein bilanzmäßiger Überblick über die Verteilung des säurelöslichen Phosphors auf die beiden Hauptfraktionen (organischer Gesamt-P ohne Kreatin-P) und (anorg. P + Kreatin-P) ergibt sich aus den Chromatogrammen nach Anwendung des I. Lösungsmittels: Die Analysenwerte für diese beiden Fraktionen in Tab. 1—3 lassen bei den meisten Versuchen aus der Acetylcholin- und Nicotinserie eine geringe Zunahme der einen Hauptfraktion (anorg. P + Kreatin-P) auf Kosten der anderen Hauptfraktion (organisches Gesamt-P ohne Kreatin-P) erkennen. Dieser Befund kann wohl nur zum Teil durch den partiellen Zerfall der „Dritten Fraktion" erklärt werden. Die gleiche P-Verschiebung war nämlich bei unseren früheren Experimenten auch bei tetanischer Verkürzung des Froschrectus (1,0—1,2 sec Dauer bei 0° C und 20° C) angedeutet, ohne daß es dabei zu einer Abnahme der „Dritten Fraktion" kam (vgl. Fleckenstein, Janke, Lechner u. Bauer). Wahrscheinlich wird also bei der tetanischen Verkürzung und bei der Acetylcholin- bzw. Nicotinkontraktur außer Kreatinphosphat und der „Dritten Fraktion" noch ein weiterer, bisher nicht identifizierter P-Ester gespalten. Bei der Succinylbischolinkontraktur ließ sich kein Hinweis auf diese Reaktion gewinnen.

Besprechung.

Die vorliegenden Versuche zeigen zunächst, daß sich hinter der Depolarisation bzw. Kontraktur des Froschrectus durch Acetylcholin, Nicotin

[1] Von G. Lange [Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 241 (1954), Experientia **10**, 268 (1954)] ist angegeben worden, bei einer Acetylcholin-Kontraktur nehme der ATP-Gehalt des M. rectus von Eskulenten um 0,25—0,30 μmol/g Muskel ab. Die Gewinnung und Aufarbeitung der Muskelextrakte nach dem Verfahren von Lange ist jedoch nicht einwandfrei: Seine Werte für AMP sind z. B. zu hoch (im Mittel 6% der Summe von ATP und ADP). Nach Lohmann u. Schuster (Biochem. Z. **272**, 24 [1934]) sind aber Werte über 2% AMP Kunstprodukte und durch nachträglichen ATP-Zerfall verursacht. Auch in eigenen Versuchen blieb AMP im M. rectus selbst nach 10 facher Anreicherung unter der Grenze der Nachweisbarkeit im Photoprintverfahren.

und Succinylbischolin keine Verschiebungen der ATP- bzw. ADP-Konzentrationen im Innern der Fasern verbergen. Für die Annahme eines „Kontraktionscyclus" mit ATP-Spaltung bei der Verkürzung und ATP-Resynthese bei der Wiederverlängerung (im Sinne von Szent-Györgyi, Bendall, Lorand und andere) ergibt sich also kein Anhaltspunkt.

Tabelle 4. *Mittlere Kreatinphosphatumsätze*[1] *bei verschiedenen pharmakologischen Kontrakturen des M. rectus.*

Kontrakturstoff	Temperatur	Einwirkungszeit sec	Kreatinphosphat-Abnahme µmol/g	Arbeit gcm/g	Arbeit % der maximalen Spaltungsenergie der Kreatinphosphat-Umsätze	Zahl der Experimente
KCl	0° C	62	1,61	78,2	9,5	8
Acetylcholin . .	0° C	90	2,34	118	9,8	6
Coffein.	0° C	150	3,71	81,5	4,3	5
Nicotin	20° C	60	4,81	62	2,5	6
Succinylbischolin	20° C	60	4,18	65,6	3,1	6
KCl	20° C	49	4,69	71,6	3,0	8
Coffein.	20° C	150	6,11	154,5	5,0	6

[1] Als Spaltungsenergie von Kreatinphosphat ist 12000 cal/Mol angenommen.

Schwerwiegende Veränderungen treten dagegen in der Kreatinphosphat-Fraktion ein: Nimmt man als Spaltungsenergie von Kreatinphosphat 12000 cal/Mol an, so beträgt die gemessene Kontraktionsarbeit nur wenige Prozent der — aus der Kreatinphosphatspaltung gewinnbaren — chemischen Energiemenge (vgl. Tab. 4). Die so berechneten Werte liegen bei der Kontraktur durch Acetylcholin, Nicotin und Succinylbischolin in der gleichen Größenordnung von etwa 3—10% wie die schon früher bei der KCl- und Coffeinverkürzung gewonnenen Daten (vgl. Fleckenstein u. Janke; Fleckenstein, Janke u. Elke).

Die Spaltung von Kreatinphosphat ist eine Folge der Depolarisation des Muskels durch die Kontrakturstoffe. Auch bei der Erregung bzw. Depolarisation nichtcontractiler Organe (Nerv, Gehirn, elektrisches Organ von Fischen) wird Kreatinphosphat abgebaut. Man muß in dieser Reaktion wahrscheinlich einen — im Dienste der Repolarisation stehenden — restitutiven Prozeß erblicken. *Für die Kontraktion selbst wird Kreatinphosphat nach unseren Ergebnissen nicht benötigt.* Auch kreatinphosphatfreie M. recti (nach 20 min Behandlung mit 2,4-Dinitrophenol-Ringer-Lösung 1 : 10000 bei 20 °) können sich z. B. bei elektrischer Reizung oder bei Einwirkung von KCl noch kräftig verkürzen. Dagegen ist die Erschlaffung solcher Muskeln aufs schwerste gestört; eine Wiederverlängerung bzw. Repolarisation nach KCl-Kontrakturen kann dann

überhaupt nicht mehr eintreten. Die Klärung dieser Zusammenhänge zwischen dem Stoffwechsel der energiereichen Phosphorsäure-Ester und der Erschlaffung bzw. Repolarisation des lebenden Muskels muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben. Die bisherigen Ergebnisse stehen jedenfalls mit der Betheschen Theorie einer „aktiven Erschlaffung" in guter Übereinstimmung.

Die besondere Bedeutung der vorliegenden Experimente scheint uns darin zu liegen, daß sie eine scharfe Abtrennung der — ohne ATP-Abnahme eintretenden — „Erregungskontrakturen" (Acetylcholin, Nicotin, Succinylbischolin) von den pathologischen Absterbeverkürzungen erlauben, bei welchen nach Bendall ein ATP Zerfall erfolgt. Offensichtlich läßt der ATP-Zerfall bei diesen Absterbeverkürzungen keine verallgemeinernden Schlüsse auf den natürlichen Mechanismus der Kontraktion bzw. der Kontrakturen zu.

Zusammenfassung.

1. Acetylcholin, Nicotin und Succinylbischolin bringen den M. rectus des Frosches durch Depolarisation der Muskelfasern zur Verkürzung. Die papierchromatographische Aufarbeitung kontrahierter und nicht kontrahierter M. recti ergibt, daß sich hinter den elektrischen bzw. mechanischen Zustandsänderungen der Fasern keine Verschiebungen der ATP- und ADP-Werte verbergen.

2. Während der Kontraktur kommt es regelmäßig zu einer Abnahme von Kreatinphosphat und wahrscheinlich zur Spaltung von 2 weiteren — noch nicht identifizierten — P-Estern.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sind wir für die Förderung der Untersuchungen sehr zu Dank verpflichtet.

Literatur.

Bendall, J. R.: The shortening of rabbit muscle during rigor mortis: its relation to the breakdown of adenosine triphosphate and creatine phosphate and to muscular contraction. J. of Physiol. **114**, 71 (1951). — Berenblum, I., and E. Chain: An improved method for the colorimetric determination of phosphate. Biochemic. J. **32**, 295 (1938). — Eggleston, L. V., and R. Hems: Seperation of adenosine phosphates by paper chromatography and the equilibrium constant of the myokinase system. Biochemic. J. **52**, 156 (1952). - Fleckenstein, A.: Über den primären Energiespeicher der Muskelkontraktion. Pflügers Arch. **250**, 643 (1948). - Korreferat: Kalium-Sensibilisatoren. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **212**, 54 (1950). — Fleckenstein, A., u. A. Hardt: Der Wirkungsmechanismus der Lokalanaesthetica und Antihistaminkörper — ein Permeabilitätsproblem. Klin. Wschr. **1949**, 360. — Fleckenstein, A., E. Wagner u. K. H. Göggel: Weitere Untersuchungen über die Abhängigkeit der Muskellänge vom Membranpotential. Der Wirkungsmechanismus kontrakturverhütender Lokalanaesthetica. Pflügers Arch. **253**, 38 (1950). — Fleckenstein, A., H. Hille u. W. E. Adam: Aufhebung der Kontraktur-Wirkung depolarisierender Katelektrotonica durch Repolarisation im Anelektrotonus. Die Anode als Antagonist von Acetylcholin, Cholin, Nicotin, Coniin, Veratrin.

Kalium- und Rubidium-Salzen usw. Pflügers Arch. **253**, 264 (1951). — Fleckenstein, A., u. F. Richter: Weitere Untersuchungen über die Aufhebung der Kontrakturwirkung von Acetylcholin, Cholin, Neurin, Nicotin, Coniin, Veratrin, Kaliumchlorid und Rubidiumchlorid durch den Anelektrotonus. Pflügers Arch. **257**, 1 (1953). — Fleckenstein, A., u. J. Janke: Papierchromatographische Trennung von ATP, ADP und anderen Phosphorverbindungen im kontrahierten und erschlafften Froschmuskel. Pflügers Arch. **258**, 177 (1953). — Fleckenstein, A., J. Janke u. M. Elke: Papierchromatographische Trennung von Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP) und von anderen Phosphorverbindungen bei der Coffein-Kontraktur des Frosch- und Krötenrectus. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **221**, 404 (1954). – Fleckenstein, A., J. Janke, G. Lechner u. G. Bauer: Zerfällt Adenosintriphosphat bei der Muskelkontraktion? Pflügers Arch. **259**, 246 (1954). — Lorand, L.: Adenosine triphosphate-creatine transphosphorylase as relaxing factor of muscle. Nature (Lond.) **172**, 1181 (1953). — Markham, R., and J. D. Smith: Chromatography of nucleic acid derivatives. Nature (Lond.) **163**, 250 (1949). — Szent-Györgyi, A.: The contraction cycle. Abstracts XIX international Physiol. Congress Montreal 1953 (S. 812).

Professor Dr. A. Fleckenstein,
Pharmakologisches Institut der Universität Heidelberg, Hauptstraße 47—51.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 224, S. 476—482 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. F. Eichholtz).

Methodische Untersuchungen zur autoradiographischen Darstellung wasserlöslicher Stoffe in der Niere*.

Von
H. Oster, H.-W. Kundt und R. Taugner**.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 4. November 1954.)

Es ist bisher verschiedentlich versucht worden, die physiologischen Ausscheidungsvorgänge in der Niere näher zu lokalisieren. Man verwendete dazu u. a. Farbstoffinjektionen (Heidenhain u. a.), Mikropunktion (Richards u. Wearn, Oliver u. Mitarb.), Mikrokryoskopie (Wirz) und Bestimmungen des osmotischen Drucks an Nierenschnitten (Ullrich u. Mitarb.). Die verfügbaren Methoden erlaubten jedoch nur die Lösung einzelner lokalisatorischer Probleme.

Weitere Fortschritte sind hier unseres Erachtens von der Autoradiographie zu erwarten. Ihre Verwendung würde davon ausgehen, daß sich i.v. injizierte radioaktive Isotope voraussichtlich an den Stellen des Nephrons anreichern, wo sie durch das Tubulusepithel hindurchtreten. Die Frage, ob es sich im einzelnen um Rückresorptions- oder Sekretionsprozesse handelt, bzw. ob die Anreicherung vom Tubuluslumen oder von intertubulären Gefäßen her entsteht, sollte in Kontrollversuchen durch Ausschaltung der Filtration zu entscheiden sein. Die Filtration kann durch Drosselung der Nierenarterie bis zur Unterschreitung des Filtrationsdruckes oder durch Ligatur der Ureteren reduziert werden. In jedem Fall wäre die Zeit von der Isotopeninjektion bis zur Entnahme der Nieren so kurz zu wählen, daß die Aktivität zum überwiegenden Teil noch in der ursprünglichen chemischen Verbindung vorliegt.

Die Autoradiographie ist jedoch bisher zum Studium tubulärer Transport- bzw. Austauschvorgänge noch nicht herangezogen worden, wahrscheinlich, weil die üblichen Verfahren zur einwandfreien Darstellung nierenfähiger, d. h. wasserlöslicher Stoffe beschränkter Molekülgröße nicht geeignet sind. Ihre Mängel bestehen vor allem in der Elution von Radioaktivität während histologischer oder radiographischer Vorarbeiten. Gleichmäßige Aktivitätsverluste wären durch höhere Isotopengaben bzw. längere Exposition zwar leicht zu kompensieren.

* Herrn Prof. Dr. F. Eichholtz zum 65. Geburtstag gewidmet.

** Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Es ist jedoch selbst bei geringfügigen Auswaschungen damit zu rechnen, daß die Aktivität im Verlauf der Vorarbeiten aus einzelnen Nierenbezirken selektiv entfernt wird. Auch Dislokationen der Radioaktivität, u. a. durch Diffusion, könnten vorkommen und sich an der Niere, wo Strukturen mit verschiedenartiger Funktion nahe beisammen liegen, besonders irreführend auswirken. Wir suchten daher nach kritischer Prüfung bekannter Verfahren nach neuen, zuverlässigeren Methoden. Mit ihrer Hilfe sollte als erstes — in Fortsetzung früherer Arbeiten von Taugner u. Mitarb. — die Ausscheidung von trägerfreiem, P^{32}-markiertem Ortho- und Glycerophosphat studiert werden. Zur Verwendung kamen die Nieren von Ratten oder Katzen 5—30 min nach der i.v. Injektion von 1—3 mC radioaktiven Ortho- oder Glycerophosphats.

Experimenteller Teil.

Von verschiedener Seite sind — mit dem Ziel möglichst geringer Aktivitätsverluste — *abgekürzte Verfahren zur Gewebsfixierung* beschrieben worden. So ermittelten Lamerton und Harris bei 2stündiger Fixierung mit absolutem Alkohol (gefolgt von Xylol und Paraffin) eine Aktivitätseinbuße von nur 15%. Holt, Cowing und Warren gelang es, die Elution von radioaktivem Orthophosphat durch Verkürzung der Formalin-Alkohol-Fixierung zu reduzieren. Als Einbettungsmittel verwendeten sie — nach Entwässerung mit Benzol oder Dioxan — ebenfalls Paraffin. Auch das freezing-drying-Verfahren, wo die Paraffineinbettung ohne vorhergehende Fixierung und damit ohne Aktivitätsverluste erfolgt, steht zur Diskussion (Leblond). Wir gingen von *Paraffinschnitten* aus, die nach den oben aufgeführten Methoden[1], außerdem nach abgekürzter Fixierung mit 96—98%igem Alkohol (2 × 6 Std, gefolgt von 2 × 30 min Benzol) sowie schulmäßiger Behandlung mit steigenden Alkoholkonzentrationen angefertigt waren. Die Schnitte wurden auf Wasser gestreckt, getrocknet, zum Teil mit Xylol entparaffiniert und schließlich mit einem Strippingfilm[2] versehen. Die Ergebnisse waren nicht befriedigend: Ähnlich wie bei der nachfolgend beschriebenen Aquaffineinbettung nach Alkoholfixierung war die Aktivität über den Rand der Gewebsschnitte hinaus dislociert. In den Versuchen mit Orthophosphat führte auch die Verwendung von Fällungsmitteln[3] nicht zu besseren Resultaten.

Die Einflüsse eines 2. Einbettungsmittels studierten wir am Beispiel von *Aquaffin*[4]. Die Gewebsstücke wurden anfangs nach den Angaben von Tietz —

[1] Die Versuche mit dem freezing-drying-Verfahren verdanken wir der Freundlichkeit von Herrn Priv. Doz. Dr. Haselmann, Anatomisches Institut der Universität, dem wir auch für verschiedene Ratschläge verpflichtet sind.

[2] Autoradiographic Plates der Fa. Kodak Ltd. London.

[3] Bei der Fixierung kamen $CaCl_2$ mit Veronalpuffer (vgl. Gomori), $FeCl_3$ oder $PbNO_3$ (in 96%igem Alkohol) sowie Ammoniummolybdat (in Salpetersäure-Pikrinsäure oder Alkohol-Salpetersäure) zur Anwendung. $CaCl_2$ mit Veronalpuffer wurde auch vor der Fixierung, während Streckung und Entparaffinierung sowie beim Aufbringen des Strippingfilms erprobt. Die Konzentration der Fällungsmittel wurde stufenweise bis zum Auftreten von Gewebsschädigungen bzw. bis zur Sättigung erhöht.

[4] Aquaffin, ein Gemisch wasserlöslicher Polyäthylenglykole, wurde uns freundlicherweise von der Fa. Bayer-Leverkusen zur Verfügung gestellt.

ohne eigentliche Fixierung — mit tiefgekühltem Äthylenglykol entwässert. Das histologische Ergebnis war dabei immer unbefriedigend. Erheblichen Gewebszerstörungen entsprechend fanden sich bei der Autoradiographie mit Strippingfilm diffuse Schwärzungen, meist über den Rand der Schnitte hinaus. Ersatz der Äthylenglykolentwässerung durch Alkoholfixierung führte zu guten histologischen Ergebnissen. Die radiographischen Bilder entsprachen etwa denen nach Paraffineinbettung (Abb. 1 u. 2) und waren offensichtlich ebenfalls von Aktivitätsverschiebungen beeinflußt.

Diese, die Gültigkeit der erzielten Bilder in Frage stellende Aktivitätsverschiebung geht nach Kontrollversuchen mit anderen radiographischen Methoden haupt-

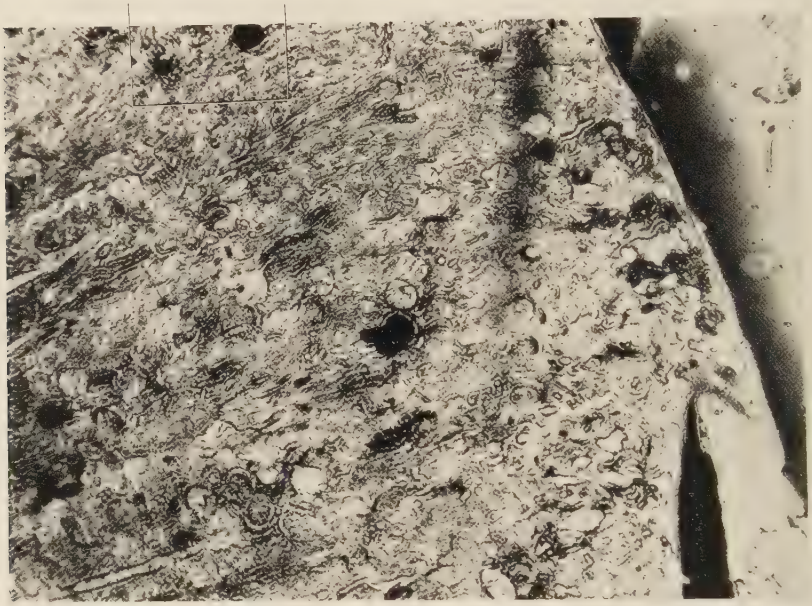


Abb. 1. Aquaffinschnitt (10 μ) aus der Niere einer Katze von 2 kg in Evipannarkose (90 mg/kg) Das Organ wurde 10 min nach i.v. Injektion von 3 mC trägerfreier $H_3P^{32}O_4$ entnommen. Die Gewebsstücke (5 × 1—2 mm) befanden sich 2 × 3 Std in 96%igem Alkohol (— 20°), 2 Std in Alkohol-Aquaffin (Verhältnis 1 : 1, etwa 30° C) und 5 Std in Aquaffin (47—50° C). Das Aquaffin wurde herausgelöst mit einer Mischung von Aquaffin (1 Teil) und Aqua dest., mit Thymol gesättigt (9 Teile, vgl. Tietz). Strippingfilm-Verfahren, Exposition 3 Wochen. Der unter dem Film befindliche Schnitt ist schwach mit Lichtgrün angefärbt. Man beachte die durch Elution bedingte diffuse Ausbreitung der radiographischen Zeichnung über den Rand des Schnittes hinaus.

sächlich zu Lasten des *Strippingfilm-Verfahrens*. Der Strippingfilm wird bekanntlich mit dem aufgezogenen Schnitt in Wasser aufgefangen. Trotz umgehender Trocknung im Exsiccator führt — bei der großen Oberfläche des Schnittes — diese kurze Wässerung zu wesentlichen Aktivitätsverschiebungen. Selbst wenn wir den Strippingfilm auf paraffinhaltige Schnitte, z. B. aus dem freezing-drying-Verfahren, aufzogen, kam es zu wesentlichen Aktivitätsverlusten.

Diese Fehler schienen durch Verwendung anderer radiographischer Methoden, z. B. des *Mounting-Verfahrens*, vermeidbar. Anstatt der dabei üblichen Streckung auf Wasser wurden die paraffinhaltigen Schnitte — nach vorsichtiger Glättung mit

Pinseln — auf den Film[1] gelegt und bis zum Anschmelzen erwärmt oder, eventuell nach Entparaffinierung, durch Auftropfen von Xylol geglättet. Auch das Verfahren von Holt u. Mitarb., wonach sich das Strecken erübrigt, wenn man die Oberfläche des Blockes vor jedem Schnitt mit einer dünnen Schicht geschmolzenen Paraffins überzieht, wurde erprobt. Einige Gewebsschnitte wurden dem Film außerdem mit einem 2. Objektträger aufgepreßt. Die Ergebnisse waren bei derartigem Vorgehen insofern besser, als die radiographische Zeichnung den Rand der Schnitte nicht überragte. Im Gegensatz zum Strippingfilm-Verfahren entstanden jedoch meist diffuse, strukturlose Bilder. Da dies auch ohne Entparaffinierung der Fall war, könnte es sich um Folgen von Fixierung, Entwässerung oder Paraffineinbettung handeln. Nach

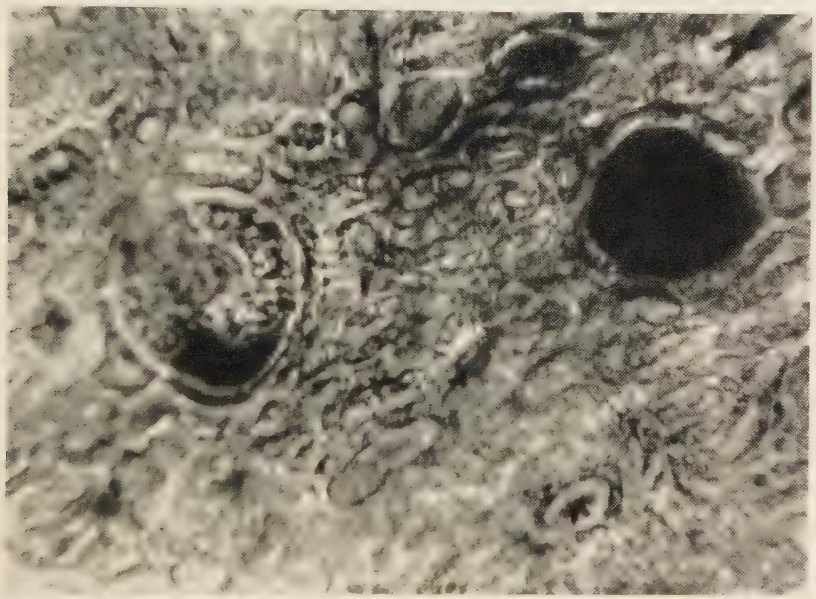


Abb. 2. Vergrößerung des in Abb. 1 gekennzeichneten Abschnittes.

den Erfahrungen von Leblond mit dem freezing-drying-Verfahren bei Zufuhr größerer Jodmengen kann schon das Eindringen von Paraffin an der Schilddrüse zu diffusen Bildern führen. Die von ihm diskutierte Alternative, daß die Aktivität möglicherweise schon in vivo gleichmäßig verteilt sei, trifft nach unseren Ergebnissen mit Gefrierschnitten für die Anordnung von P^{32} in der Niere nicht zu. Die mit dem Strippingfilm-Verfahren erhaltenen differenzierten Bilder könnten allerdings nach den Erfahrungen mit der Mounting-Methode durch selektive Elutionen bedingt sein.

Nach diesen enttäuschenden Ergebnissen kamen für die Darstellung wasserlöslicher kleinmolekularer Stoffe nur noch *Gefrierschnitte*[2] nach

[1] In Ermangelung geeigneten Filmmaterials wurde auch hierzu Strippingfilm verwendet, der vorher mit der photographischen Emulsion nach oben aufgezogen und getrocknet worden war.

[2] Gefrierschnitte sind schon von Odeblad, jedoch bei vorheriger Formalin-Trichloressigsäure-Fixierung und späterer Verwendung wäßriger Medien benützt worden.

Schultz-Brauns in Frage, die Fixierung, Entwässerung und Einbettung entbehrlich machen. Als radiographisches Verfahren scheint nur die *Kontaktmethode* zuverlässig. Wir fingen die Gefrierschnitte[1] anfangs bei Zimmertemperatur an Stelle von Objektträgern mit dem Film auf, wo sie durch Auftauen haften blieben. Die radiographischen Bilder waren jedoch, wahrscheinlich infolge dieses Auftauens, meist schollig verschmiert. Das Verfahren wurde daher für unsere Zwecke dahingehend modifiziert, daß die Schnitte in einer Kühlkammer bei —8 bis —5° C

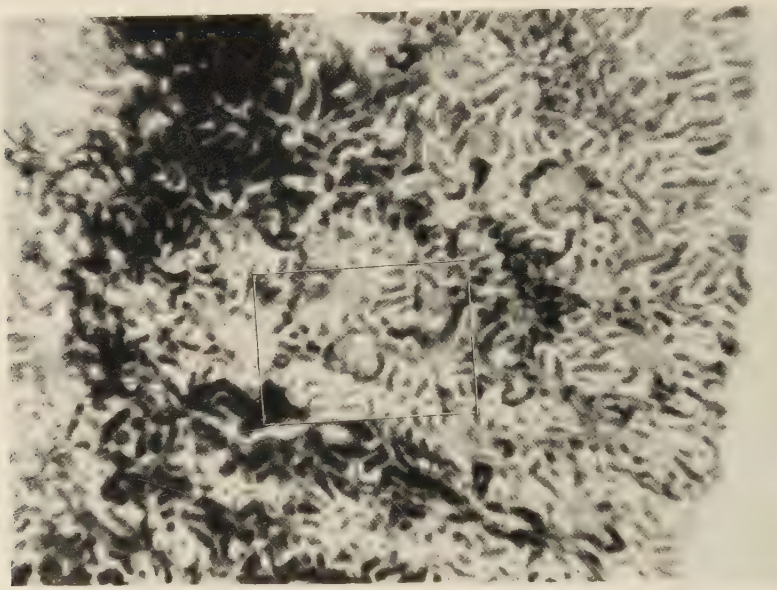


Abb. 3. Gefrierschnitt aus der Niere einer Ratte von 100 g, 10 min nach der i.v. Injektion von 2 mC trägerfreiem, radioaktivem Glycerophosphat. Dicke des Schnitts: 10 μ. Exposition: 3 Wochen. Filmmaterial: Strippingfilm, nach dem Kontaktverfahren verwendet. Keine flüssigen Medien, kein Auftauen. Nähere Erläuterung siehe Text. Die Aufnahme gibt nur die radiographische Zeichnung ohne Schnitt wieder. Man beachte die Anhäufung der Aktivität im Bereich der Mark-Rinden-Grenze.

hergestellt und ohne jedes Auftauen bei —20° zur Exposition gelagert wurden.

Das Strecken erfolgte mit Pinseln auf dem tiefgekühlten Mikrotommesser. Anschließend legten wir die Schnitte auf vorgekühlte Objektträger. Das trockene Filmmaterial wurde mit Wäscheklammern darauf befestigt und 3—5 Wochen später getrennt entwickelt. Die Darstellung der zugehörigen Gewebsschicht kann an alternierend hergestellten, nicht zur Radiographie verwendeten Schnitten nach den Richtlinien von Schultz-Brauns vorgenommen werden.

In den Abb. 3 u. 4 ist ein Beispiel für die Leistungsfähigkeit dieser — wahrscheinlich optimalen — Methode wiedergegeben. Elutionen kommen

[1] Wir verwendeten das neue mit Messertiefkühlung ausgestattete Kohlensäure-Gefrier-Mikrotom CM der Fa. C. Jung-Heidelberg, das sich sehr gut bewährte.

als Fehlerquelle nicht in Frage. Auch Dislokationen dürften keine bedeutende Rolle spielen. Die Möglichkeit, daß der Film durch unfixiertes Gewebe beeinflußt wird (Boyd u. Board) kann in Parallelversuchen ohne Isotopeninjektion kontrolliert werden. Das Ergebnis ist allerdings, wie auch sonst bei der Kontaktmethode, von dem gleichmäßig engen Kontakt zwischen Film und Schnitt abhängig, der z. B. durch kleine Unebenheiten oder Falten gestört sein kann.

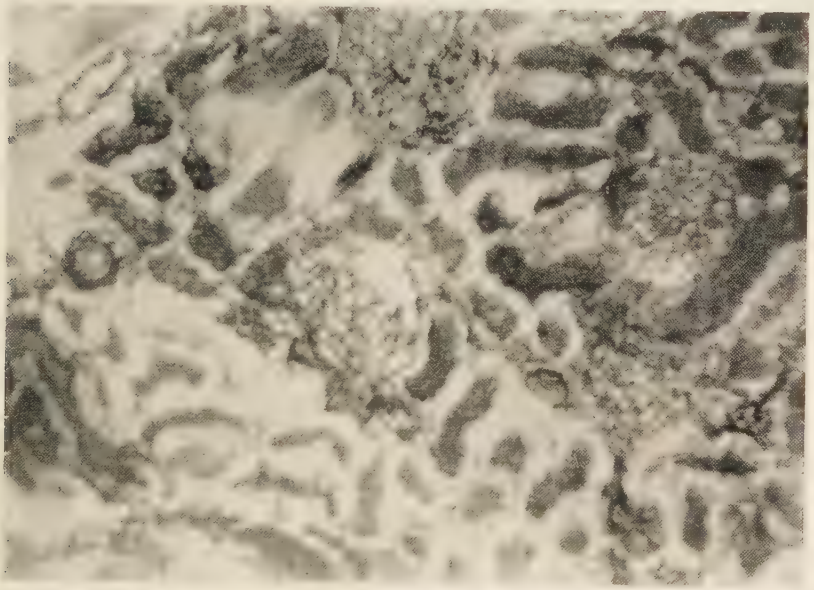


Abb. 4. Vergrößerung des in Abb. 3 gekennzeichneten Abschnittes.

Zusammenfassung.

Nach kritischer Prüfung bekannter Verfahren werden Gefrierschnitte nach Schultz-Brauns zur autoradiographischen Darstellung wasserlöslicher Stoffe in der Niere empfohlen. Die Schnitte sollten zur Vermeidung des Auftauens in einer Kühlkammer hergestellt und für die Exposition in der Kälte gelagert werden.

Literatur.

Boyd, G. A., and F. A. Board: A preliminary report on histochemography. Science (Lancaster, Pa.) **110**, 586 (1949). — Gomori, G.: Mikrotechnical demonstration of phosphatase in tissues. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **42**, 23 (1939). — Heidenhain, R.: Versuche über den Vorgang der Harnabsonderung. Pflügers Arch. **9**, 1 (1874). — Holt, M. W., R. F. Cowing and S. Warren: Preparation of radioautographs of tissues without loss of water-soluble P^{32}. Science (Lancaster, Pa.) **110**, 328 (1949). — Lamerton, L. F., and Harris: Some autoradiographic studies of non-uniform distribution of radioactive phosphorus in tissues. Brit.

Med. J. **4737**, 932 (1951). — Leblond, C. P.: Locating iodine in tissues autoradiographically, especially after fixation by freezing and drying. Stain Technol. **18**, 159 (1943). — Odeblad, E.: A technique of Autoradiography. Scand. J. clin. Laborat. Investig. **3**, 151 (1951). — Schultz-Brauns, O.: Eine neue Methode des Gefrierschneidens für histologische Schnelluntersuchungen. Klin. Wschr. **1931**, 113. - Verbesserungen und Erfahrungen bei der Anwendung der Methode des Gefrierschneidens unfixierter Gewebe. Zbl. Path. **54**, 225 (1932). — Tietz, H.: Eine Schnelleinbettungsmethode für histologische Präparate mit „Synthawachsgemischen" unter Umgehung der Alkoholstufen, besonders nach Imbibition mit leicht wasser- und lipoidlöslichen Stoffen. Z. wiss. Mikrosk. **61**, 129 (1952). — Ullrich, K. J., G. Riecker u. H. H. Jarausch (Marburg): Untersuchungen zum Problem der Harnkonzentrierung und Verdünnung. Vortrag, gehalten auf dem Physiologen-Kongreß in Heidelberg am 16. September 1954. — Walker, A. M., P. A. Bott, J. Oliver and M. C. MacDowell: The collection and analysis of fluid from single nephrons of the mammalian kidney. Amer. J. Physiol. **134**, 580 (1941). — Wearn, J. T., and A. N. Richards: Observations on the composition of glomerrular urine with particular reference to the problem of reabsorption in the renal tubules. Amer. J. Physiol. **71**, 209 (1924). — Wirz, H.: Der osmotische Druck des Blutes in der Nierenpapille. Helvet. physiol. Acta **11**, 20 (1953).

Dr. H. Oster, Dr. H.-W. Kundt und Dr. R. Taugner,
Heidelberg, Pharmakol. Inst. d. Universität.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 224, S. 483—495 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. F. Eichholtz).

Adsorptionsversuche an der Kollodiummembran zur Differenzierung endplattenblockierender Pharmaka mit depolarisierender bzw. depolarisationshemmender Grundwirkung*.

Von
A. Fleckenstein, J. Eigler und H. Bruch.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 29. November 1954.)

In vorausgegangenen Untersuchungen hat sich ergeben, daß der Nervenblock durch Pharmaka den bekannten Gesetzen der Elektrophysiologie gehorcht: Die üblichen Lokalanaesthetica unterbrechen die Nervenleitung durch Hemmung der Depolarisation; sie rufen damit einen Zustand hervor, der dem Anodenblock der Elektrophysiologie ähnelt (vgl. Fleckenstein 1948, 1950a; Fleckenstein u. Hardt 1949). Der entgegengesetzte Mechanismus gilt für den Nervenblock durch eine Reihe depolarisierender Stoffe: diese Substanzen unterbrechen die Nervenleitung nach Art des Kathodenblocks. Die Lokalanaesthetica wurden daher von uns als „Anelektrotonica", depolarisierende Stoffe mit leitungsunterbrechender Wirkung als „Katelektrotonica" bezeichnet. Der leitungsunterbrechende Effekt der Katelektrotonica ist durch anodische Polarisation zu neutralisieren (vgl. Fleckenstein 1950b, 1950c, 1951).

Während unsere Untersuchungen dem Block der Nervenleitung galten, wurde von Paton u. Mitarb. der Block an den Endplatten studiert. Auch hier kann die Erregungsübertragung nach den gleichen Grundmechanismen wie am Nerven unterbrochen werden: Succinylbischolin und Dekamethonium hemmen die Erregungsübertragung durch Depolarisation der Endplattenregion (Burns u. Paton, 1951). Diese Stoffe wären nach unserer Nomenklatur „Endplatten-Katelektrotonica". Im Gegensatz dazu tritt der Block nach Curare- oder Flaxedilverabreichung infolge einer Hemmung der Depolarisation, d. h. des Endplattenstroms ein („Endplatten-Anelektrotonica").

Es ist ein wichtiges pharmakologisches Problem, auf Grund welcher chemischen bzw. physikalisch-chemischen Eigenschaften stickstoffhaltige Basen wie Flaxedil bzw. Succinylbischolin zu derart entgegengesetzten Membraneffekten befähigt sind.

* Herrn Prof. Dr. F. Eichholtz zum 65. Geburtstag gewidmet.

Auf der Suche nach den Ursachen stießen wir in Modellversuchen an der Kollodiummembran auf Unterschiede in der Adsorbierbarkeit (Fleckenstein, Günther u. Winker, 1951): Alkaloidbasen mit erregenden, depolarisierenden Eigenschaften („Agonisten") wurden von den negativen „Receptoren" der Kollodiummembran meist nur locker adsorbiert und durch Auswaschen wieder rasch entfernt. Dagegen war die Haftfestigkeit von Alkaloidbasen mit depolarisationshemmenden Eigenschaften („Antagonisten") meist stärker. In nicht wenigen Fällen war die Adsorption selbst durch tagelanges Spülen nicht mehr rückgängig zu machen. Depolarisierende und depolarisationshemmende Alkaloidkationen scheinen also schon durch relativ einfache physikalisch-chemische Kriterien voneinander unterscheidbar zu sein. Diese Regel wurde bisher an über 100 verschiedenen Alkaloidbasen bestätigt gefunden.

Unter den geprüften Stoffen befanden sich jedoch — abgesehen von Curare — keine Substanzen mit spezifischen Wirkungen auf die Endplatten. Es war daher wichtig zu untersuchen, ob diese physikalisch-chemischen Charakteristika auch für die beiden Gruppen endplattenblockierender Pharmaka zutreffen.

Besonderes Interesse können in diesem Zusammenhang Succinylbischolin, Adipinbischolin und Decamethonium beanspruchen, bei denen mit zunehmender Substitution ihrer Methylgruppen durch Äthylreste der depolarisierende Wirkungscharakter ins Gegenteil umschlägt (Ginzel, Klupp u. Werner 1952). Die folgenden Untersuchungen sollten klären,

a) ob auch innerhalb dieser Reihen der Übergang vom depolarisierenden zum depolarisationshemmenden Wirkungstyp durch eine Zunahme der Adsorbierbarkeit an der Kollodiummembran charakterisiert ist,

b) ob sich aus den physikalisch-chemischen Grundeigenschaften unter Umständen Hinweise auf den Mechanismus der Depolarisation bzw. der Depolarisationshemmung ergeben.

Experimenteller Teil.

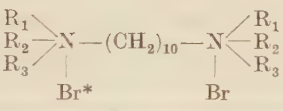
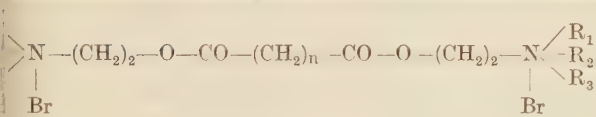
Methodik. Die fortlaufende Messung der Alkaloidadsorption an der Kollodiummembran erfolgte nach dem von Fleckenstein, Günther u. Winker (1951) ausgearbeiteten elektrischen Verfahren. Während der „Adsorptionsphase" wurden die Alkaloidsalze (Konz. $^1/_{50}$ mol in $^1/_{100}$ mol KCl Lösung) in der Kollodiumhülse jeweils für 45 min zur Einwirkung gebracht. Die in Abhängigkeit von der Alkaloidadsorption in den Membranporen eintretenden Potentialveränderungen erreichten während dieser Zeitspanne fast regelmäßig einen konstanten Endwert. Nach 45 min wurde mit dem Auswaschen begonnen (Auswaschphase): Die Alkaloid-KCl-Lösung wurde ausgegossen. Die Membranhülse 3mal kurz mit reichlich Aqua dest. gespült und eine reine $^1/_{100}$ mol KCl-Lösung eingefüllt. Anschließend (etwa 1 min später) wurde das Potential gemessen. Nach 5 min und 10 min wurde die 3malige Spülung mit Aqua dest. und die folgende Potentialmessung — nach erneuter Einfüllung von reiner $^1/_{100}$ mol KCl-Lösung — wiederholt.

In der „Auswaschphase" entwickeln sich die während der „Adsorptionsphase" eingetretenen Potentialveränderungen mehr oder weniger schnell zurück: Locker adsorbierbare Alkaloidbasen lösen sich von der Membran rasch wieder los. Das Potential der Kollodiummembran kehrt in solchen Fällen unter Umständen schon

nach wenigen Minuten zu den Ausgangswerten vor der Alkaloidadsorption zurück. Fest adsorbierbare Alkaloidbasen haben dagegen sehr langdauernde Potentialveränderungen der Membran zur Folge; das ursprüngliche Potential der Kollodiummembran kann dann unter Umständen selbst durch tagelanges Spülen nicht mehr zu den Ausgangswerten restituiert werden.

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde die „Auswaschphase" nur 90 min lang verfolgt. Die Messungen wurden jeweils 1, 5, 10, 15, 25, 35, 45, 55, 75 und 90 min nach Beginn der Auswaschphase durchgeführt. Die Spülung mit Aqua dest. erfolgte nur nach den ersten 3 Messungen. Nach den späteren Messungen (15 bis 90 min) wurde die reine $^1/_{100}$ mol KCl-Lösung in der Membranhülse nicht mehr ausgewechselt. Mit jeder der in Tab. 1 aufgeführten Substanzen wurden mindestens 6 Versuche durchgeführt und daraus eine mittlere Adsorptionskurve ermittelt. Die verwendeten Substanzen wurden uns von den Österreichischen Stickstoffwerken Linz durch liebenswürdige Vermittlung von Herrn Prof. v. Brücke zur Verfügung gestellt.

Tabelle 1. *Formeln und Kurzbezeichnungen der geprüften Stoffe* (nach Ginzel, Klupp u. Werner, 1952).

	R_1	R_3	R_2		
	CH_3	CH_3	CH_3	C_{10}	
	CH_3	CH_3	C_2H_5	M_{129}	
	CH_3	C_2H_5	C_2H_5	M_{128}	
	C_2H_5	C_2H_5	C_2H_5	M_{127}	
				$n = 2$	$n = 4$
	CH_3	CH_3	CH_3	M_{115}	M_{111}
	CH_3	CH_3	C_2H_5	M_{126}	M_{114}
	CH_3	C_2H_5	C_2H_5	M_{131}	M_{124}
	C_2H_5	C_2H_5	C_2H_5	M_{130}	M_{106}

* Die Stoffe C_{10}, M_{131}, M_{124} und M_{106} lagen als Iodide vor.

Ergebnisse.

I. Decamethonium und seine Äthylderivate.

Decamethonium (C_{10}) ist nach den eingehenden Untersuchungen von Burns u. Paton (1951) eine Substanz mit hauptsächlich depolarisierenden Eigenschaften. Nach Beobachtungen von Brown, Paton u. Vianna Dias (1949) besitzt es an der Katze bei intraarterieller Injektion schon in γ-Mengen potentialsenkende Effekte (Messung des Demarkationspotentials am M. tibialis). Am Froschrectus ruft C_{10} ähnlich wie Acetylcholin und Nicotin eine Kontraktur hervor (Paton u. Zaimis, 1949). Auch dieser motorische Effekt beruht auf einer Entladung des Membranpotentials; denn nach Untersuchungen von Fleckenstein, Hille u. Adam (1951) läßt sich am isolierten, mittleren Segment des M. rectus die C_{10}-Kontraktur durch künstliche Wiederaufladung der Membran im Anelektrotonus sofort beseitigen. Die Vogelmuskulatur wird durch C_{10} ebenfalls in Kontraktur versetzt. Auch hier kann durch anodische Repolarisation mit Gleichstrom die Kontraktur ausgelöscht werden (Ginzel, Klupp u. Werner, 1952). Decamethonium gehört also auf Grund dieser Kriterien in die Gruppe pharmakologischer „Katelektrotonica" (Näheres siehe Besprechung).

Tabelle 2. *Pharmakologische Wirkungen von Decamethonium und den stärker äthylierten Derivaten.*

Substanz	Traubenmuskel Kontraktur	Froschrectus Kontraktur	Potential-Beeinflussung	sonstige Eigenschaften
Decamethonium C_{10}	+	+ (1:10000)	Depolar. (R) (Gr)	
Monoäthyl-derivat M_{129}	+ (im 4facher C_{10}-Konz.)	(—) (1:5000)	Hemmung d. Depol. (R)	
Diäthylderivat M_{128}	(—)	(—) (1:5000)	Hemmung d. Depol. (R)	Antagonismus gegen Kontrakturstoffe
Triäthylderivat M_{127}	(—)	(—) (1:5000)	Hemmung d. Depol. (R)	

(R) = M. rectus vom Esculenten.
(Gr) = M. gracilis der Katze (nach Ginzel, Klupp u. Werner).
\+ = kontrakturerregend.
(—) = kontrakturhemmend.

Schon die einfache, symmetrische Äthylierung von C_{10} bringt jedoch eine tiefgreifende Änderung im Wirkungscharakter mit sich. Aus der tabellarischen Übersicht, die sich auf die Untersuchungen von Ginzel, Klupp u. Werner sowie auf

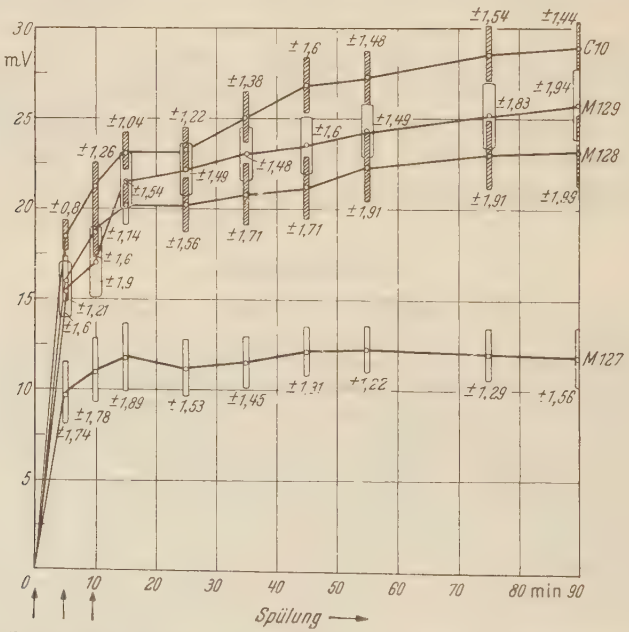


Abb. 1. Reversibilität der Adsorption von Decamethonium (C_{10}) und der Äthylderivate an der Kollodiummembran. Fortlaufende elektrische Messung der Rückkehr des Potentials in Richtung auf die vor der Alkaloidadsorption bestehenden Ausgangswerte. C_{10} löst sich am besten von der Membran ab; die Haftfestigkeit der Derivate nimmt mit steigender Äthylierung zu. Zu jedem Kurvenpunkt ist der mittlere Fehler des Mittelwerts angegeben (Versuche an jeweils 6 Membranen).

ergänzende eigene Beobachtungen stützt, sind die charakteristischen Eigenschaften dieser Äthylderivate ersichtlich: Am Froschrectus vermag bereits das Monoäthylderivat (M_{129}) nicht mehr zu depolarisieren, sondern wird zum Antagonisten depolarisierender Pharmaka. Es kann dementsprechend — nach Beobachtungen von Ginzel, Klupp u. Werner — eine C_{10}-Kontraktur lösen. Am Taubenmuskel wurden dagegen noch schwache Kontrakturwirkungen gefunden. Die Di- und Triäthylderivate von C_{10} sind in allen Fällen eindeutige Hemmstoffe für Depolarisation und Kontraktur.

Unsere Untersuchungen an der Kollodiummembran ergaben nun, daß sämtliche Substanzen der Decamethoniumreihe in den negativen „Poren" rasch adsorptiv eingelagert werden; sie führen daher während 45 min Einwirkungsdauer einer $^1/_{50}$ mol-Lösung zu einer Umkehr des Ausgangspotentials (im allgemeinen von +30 mV auf etwa −30 mV). Während diese „Adsorptionsphase" keine charakteristischen Verschiedenheiten zwischen C_{10} und seinen Äthylierungsprodukten ergibt, treten in der „Auswaschphase" deutliche Unterschiede der Haftfestigkeit zutage: C_{10} löst sich am raschesten von der Membran los. Die Haftfestigkeit der Äthylderivate nimmt dagegen mit dem Grad der Äthylierung zu. Die größten Affinitäten zu den negativen „Membranreceptoren" hat das Triäthylderivat M_{127}. In Abb. 1 ist die Reversibilität der adsorptiven Bindung der einzelnen Stoffe wiedergegeben. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß die stärkere Haftfestigkeit der Äthylderivate von C_{10} unter Umständen auch die antagonistischen Effekte erklärt, die diese Stoffe gegenüber C_{10} und anderen weniger fest adsorbierbaren, depolarisierenden Alkaloidkationen (Acetylcholin, Succinylbischolin, Nicotin) auszuüben vermögen.

II. Succinylbischolin und seine Äthylderivate.

Tabelle 3. *Pharmakologische Wirkung von Succinylbischolin und den stärker äthylierten Derivaten.*

Substanz	Taubenmuskel Kontraktur	Froschrectus Kontraktur	Potential-Beeinflussung	sonstige Eigenschaften
Succinylbischolin M_{115}	+	+ (1:5000)	Depolar. (R)	
Monoäthylderivat M_{126}	+	+ (1:5000)	Depolar. (R)	
Diäthylderivat M_{131}	(—)	(—) (1:5000)	Hemmung d. Depol. (R)	
Triäthylderivat M_{131}	(—)	(—) (1:5000)	Hemmung d. Depol. (R)	curareartige Wirkungen

(R) = M. rectus vom Esculenten.
+ = kontrakturerregend. (—) = kontrakturhemmend.

Succinylbischolin (M_{115}) steht in seinen pharmakologischen Eigenschaften dem Decamethonium nahe (Bovet u. Mitarb., 1951, Castillo u. de Beer, 1950). Ähnlich wie C_{10} verursacht M_{115} auf Grund seiner depolarisierenden Wirkung an der Frosch- und Taubenmuskulatur eine kräftige Kontraktur. Anodische Polarisation mit Gleichstrom kann nach unseren Beobachtungen am isolierten mittleren Segment des Froschrectus eine sofortige Erschlaffung erzwingen. Prostigmin verstärkt die

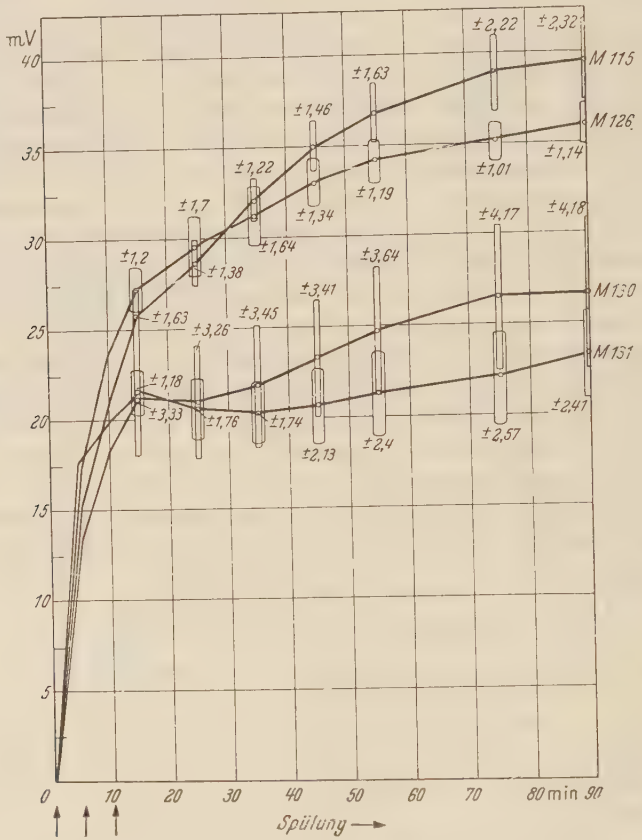


Abb. 2. Reversibilität der Adsorption von Succinylbischolin (M_{115}) und der Äthylderivate an der Kollodiummembran. Zwischen dem Kurvenverlauf von Succinylbischolin und seinem gleichfalls depolarisierenden Monoäthylderivat besteht kein signifikanter Unterschied. Die depolarisationshemmenden Di- und Triäthylderivate besitzen größere Haftfestigkeit.

depolarisierende Wirkung von Succinylbischolin und fördert daher den Succinylbischolinblock an den Endplatten (Bovet u. Mitarb., 1951). Das Monoäthylderivat von Succinylbischolin (M_{126}) besitzt ebenfalls noch depolarisierende Wirkungen. Bei den Di- und Triäthylverbindungen schlägt dieser Effekt jedoch ins Gegenteil um (Depolarisations- und Kontrakturhemmung).

In Abb. 2 sind die Adsorptionsdiagramme an der Kollodiummembran während der Auswaschphase wiedergegeben: Succinylbischolin und sein

Monoäthylderivat zeigen — als depolarisierende Stoffe — entsprechend den Erwartungen nur eine schwache Haftfestigkeit. Demzufolge bewegt sich das Potential der Kollodiummembran sehr rasch in Richtung auf die Ausgangswerte zurück (39,5 mV im Laufe von 90 min). Das Monoäthylderivat wird etwas dauerhafter adsorbiert. Der Kurvenverlauf in Abb. 2 ist jedoch gegenüber Succinylbischolin nicht signifikant verschieden. Erheblich höhere Affinitäten besitzen die Di- und Triäthylverbindungen (M_{131} und M_{130}). Diese Ergebnisse zeigen, daß auch in der Gruppe von Succinylbischolin der Wirkungsumschlag von der Depolarisation zur Depolarisationshemmung durch einen Anstieg die Haftfestigkeit an der Kollodiummembran charakterisiert ist.

III. Adipinbischolin und seine Äthylderivate sowie Flaxedil.

Tabelle 4. *Pharmakologische Wirkungen von Adipinbischolin und den stärker äthylierten Derivaten.*

Substanz	Taubenmuskel Kontraktur	Froschrectus Kontraktur	Potential-Beeinflussung	sonstige Eigenschaften
Adipinbischolin M_{111}	+	+ (1:5000)	Depolar. (Gr) (R)	
Monoäthylderivat M_{114}	+	+ (1:5000)	Depolar. (R)	
Diäthylderivat M_{124}	+ (—)	(—) (1:5000)	Hemmung d. Depol. (R)	oft schwache Depol.
Triäthylderivat M_{106}	(—)	(—) (1:5000)	Hemmung d. Depol. (R)	Curaretyp am Froschmuskel

(R) = M. rectus vom Esculenten.
(Gr) = M. gracilis der Katze (nach Ginzel, Klupp u. Werner).
\+ = kontrakturerregend; (—) = kontrakturhemmend.

Adipinbischolin (M_{111}) unterscheidet sich in der chemischen Struktur von Succinylbischolin nur durch die Verlängerung der verbindenden Kohlenstoffkette um 2 C-Atome. Auch im pharmakologischen Wirkungscharakter bestehen gegenüber Succinylbischolin keine prinzipiellen Verschiedenheiten; denn beide Stoffe stimmen in ihrer depolarisierenden Grundwirkung überein. Tauben- und Froschmuskeln reagieren daher auch auf Adipinbischolin mit Kontrakturen. Die Kontraktur des Froschrectus ist nach eigenen Beobachtungen durch anodische Repolarisation prompt auszulöschen. Zweifache und dreifache Äthylierung führt auch bei Adipinbischolin zu Substanzen vom entgegengesetzten Wirkungstyp (Hemmung depolarisierender Kontrakturstoffe am Froschrectus). Weniger scharf scheint der Wirkungsumschlag an der Taubenmuskulatur zu sein; denn nach Beobachtungen von Ginzel, Klupp u. Werner kann das Diäthylderivat unter Umständen noch schwache Kontrakturen hervorrufen. Bei Anwendung des 3fach äthylierten Produktes wurden auch am Taubenmuskel keine Kontrakturen mehr gesehen.

Die pharmakologischen Eigenschaften spiegeln sich nach unseren Ergebnissen auch an der Kollodiummembran wieder: Adipinbischolin und sein Monoäthylderivat lösen sich relativ leicht von der Membran ab, die 2- und 3fach äthylierten Derivate werden dagegen dauerhafter gebunden (vgl. Abb. 3). Der Umschlag vom depolarisierenden zum depolarisationshemmenden Wirkungstyp fällt also wieder mit einer bedeutenden Zu-

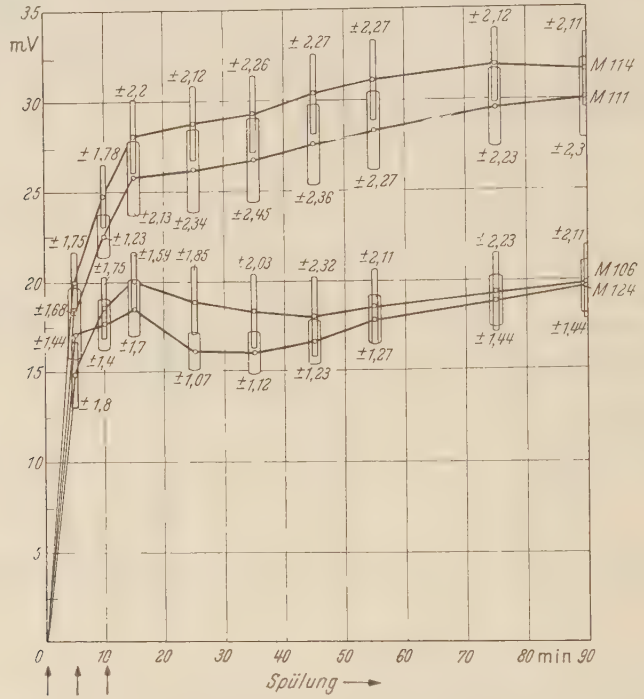


Abb. 3. Reversibilität der Adsorption von Adipinbischolin (M_{III}) und der Äthylderivate an der Kollodiummembran. Ähnlich wie in der Reihe des Succinylbischolin bestehen zwischen Adipinbischolin und seinem depolarisierenden Monoäthylderivat keine bedeutenden Unterschiede in der Haftfestigkeit an der Kollodiummembran. Durch 2fache und 3fache Äthylierung wird die Affinität zu den Membranreceptoren bedeutend gesteigert; gleichzeitig schlägt die Wirkung am Froschmuskel in eine Hemmung der Depolarisation um.

nahme der Haftfestigkeit an den negativ geladenen Strukturen der Kollodiummembran zusammen.

Vergleichsversuche mit Flaxedil (1, 2, 3-Tri-[β-triäthylammoniumäthoxy]-benzol-trijodid)[1] ergaben, daß diese Substanz mit ausgesprochen curareartigen, depolarisationshemmenden Eigenschaften noch erheblich stärker an der Kollodiummembran fixiert wird als die Triäthylderivate von Decamethonium, Succinylbischolin und Adipinbischolin (vgl. Abb. 4).

[1] Für die Überlassung von Flaxedil sind wir der Fa. C. H. Boehringer Sohn, Ingelheim am Rhein, sehr zu Dank verpflichtet.

Besprechung.

Die vorliegenden Versuche zeigen, daß Substanzen wie Succinylbischolin, Adipinbischolin und die Monoäthylderivate beider Stoffe sowie Decamethonium geringere Affinitäten zu den negativen Receptoren der Kollodiummembran besitzen als die entsprechend stärker äthylierten Verbindungen. Ordnet man alle diese endplattenblockierenden Stoffe nach ihrer zunehmenden Haftfestigkeit an der Kollodiummembran, so ergibt sich folgende Reihe:

$$M_{115} < M_{126} < M_{114} < M_{111} < C_{10}$$
Depolarisation

$$M_{130} < M_{129} < M_{128},\ M_{131} < M_{106},\ M_{124} < M_{127} < \text{Flaxedil}$$
Hemmung der Depolarisation

Die Substanzen mit depolarisierender Wirkung stehen dabei am Anfang, die mit depolarisationshemmender Wirkung am Ende (vgl. Abb. 4); am stärksten haftet Flaxedil. Alle locker adsorbierbaren Stoffe aus dieser Reihe erzeugen an der Frosch- und Vogelmuskulatur durch Depolarisation Kontrakturen, alle stark haftenden hemmen die Depolarisation und können Kontrakturen verhindern.

Die Adsorbierbarkeit steigt im großen und ganzen mit wachsendem Molekulargewicht; jedoch ist dieses nicht allein entscheidend, denn die Substanzen M_{131} und M_{114} weisen z. B. gleiches Molekulargewicht auf, unterscheiden sich aber stark in ihrer Adsorbierbarkeit. Für die Stellung der einzelnen Substanzen in der Adsorptionsreihe war der in der Auswaschphase während 90 min erreichte Endwert des Potentials maßgebend. Die Unterschiede zwischen benachbarten Gliedern der Reihe sind in Anbetracht der — teilweise nicht unerheblichen — Streuung der einzelnen Kurvenverläufe (mittlere Fehler der Mittelwerte, vgl. Abb. 1—3) nicht immer signifikant. Die Überprüfung der Resultate mit einem verbesserten Verfahren an dünnen Kollodiummembranen hat jedoch neuerdings zu einer praktisch identischen Adsorptionsreihe geführt, so daß die prinzipielle Stellung der einzelnen Substanzen hinreichend gesichert ist. Mit dem neuen Verfahren ergab sich die Reihe:

$$M_{115} < M_{114} < M_{126} < M_{111} < C_{10}$$
Depolarisation

$$M_{131} < M_{129} < M_{130} < M_{128} < M_{124} < M_{106} < M_{127} < \text{Flaxedil}$$
Hemmung der Depolarisation

Besonders charakteristisch ist, daß die stärker adsorbierten Verbindungen gegen die locker adsorbierten Stoffe auch in vivo antagonistisch zu wirken vermögen. Die Vermutung liegt nahe, daß dabei Verdrängungsreaktionen im Spiele sind. Eine derartige „competitive inhibition" könnte nach unseren Meßergebnissen als eine physikalisch-chemische Konsequenz angesehen werden, die sich aus den Verschiedenheiten der Haftfestigkeit ergibt.

Nach den vorliegenden Messungen wird Succinylbischolin von der Membran am lockersten gebunden und dementsprechend durch

Auswaschen am raschesten entfernt. Decamethonium haftet an der Membran bedeutend stärker. Es steht, beurteilt nach seinen Affinitäten zur Kollodiummembran, hart an der Grenze zwischen den depolarisierenden und depolarisationshemmenden Stoffen. Diese Stellung in der Adsorptionsreihe findet eine gewisse Parallele im pharmakologischen Wirkungscharakter:

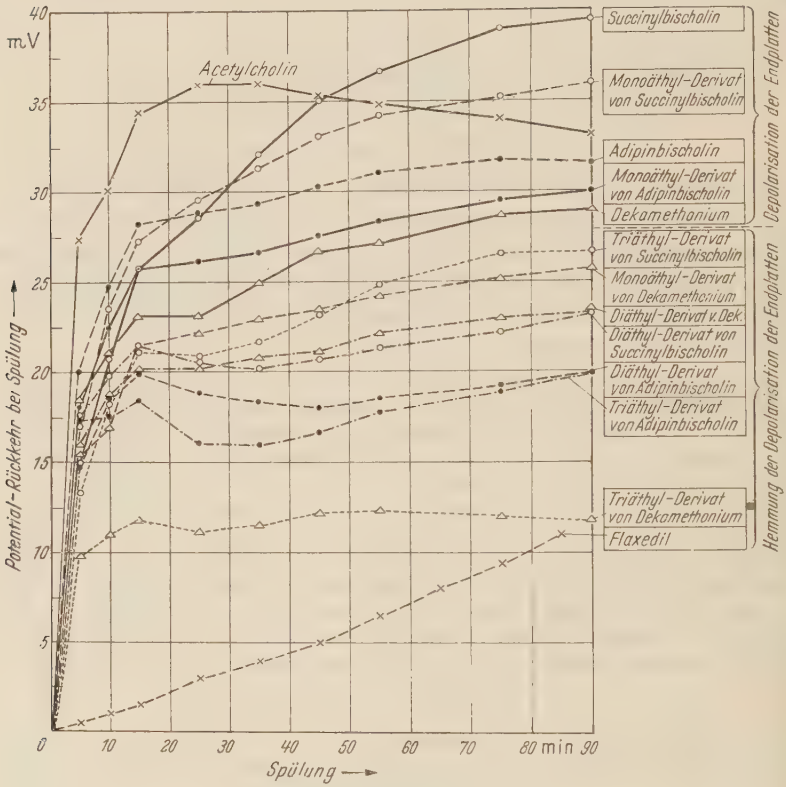


Abb. 4. Vergleich der Reversibilität der adsorptiven Bindung sämtlicher — in den vorliegenden Versuchen geprüfter — Alkaloidbasen mit Endplattenwirkung. Die depolarisierenden Stoffe lösen sich schneller von der Membran ab, als die depolarisationshemmenden Stoffe. Die Adsorption von Acetylcholin ist besonders schnell reversibel. Flaxedil haftet am stärksten.

Während Decamethonium nach den ersten Ergebnissen von Paton u. Mitarb. bei Fröschen, Vögeln, Katzen und beim Menschen als ausschließlich depolarisierender Stoff erschien, haben sich in letzter Zeit an anderen Tierspecies Beobachtungen über depolarisationshemmende Effekte von Decamethonium gehäuft (Zaimis, 1953). Nach der ursprünglichen Auffassung schienen Decamethonium und Curare stets nach diametral entgegengesetzten Mechanismen zu wirken; denn der neuromuskuläre Block durch Decamethonium beruht bei der Katze auf einer

starken Depolarisation der Endplattenregion, die durch Prostigmin unter Umständen noch verstärkt wird (Zaimis, 1951). Curare beeinflußt dagegen die Endplattenregion im umgekehrten Sinn, d. h. durch Hemmung der Endplattendepolarisation (Endplattenstrom) und wird durch Prostigmin abgeschwächt. Diese Verhältnisse gelten aber offenbar nicht für den Decamethoniumblock bei Affen, Hunden, Meerschweinchen, Ratten und Hasen. Hier zeigt Decamethonium im wesentlichen curareähnliche Eigenschaften. Prostigmin wirkt dann unter Umständen als Decamethoniumantagonist (vgl. Philippot u. Dallemagne, 1952). Selbst verschiedene Muskeln des gleichen Tieres können verschieden auf Decamethonium reagieren. In anderen Fällen kann nach anfänglicher Depolarisation der Block sekundär den Charakter eines Curareblocks annehmen. Alle diese Ergebnisse kennzeichnen Decamethonium als eine Substanz die unmittelbar an der Schwelle zwischen den depolarisierenden und depolarisationshemmenden Stoffen steht (vgl. Paton u. Zaimis, 1952).

Einfache Äthylierung von C_{10} genügt bereits, um es in einen Stoff mit eindeutig depolarisationshemmenden Eigenschaften zu verwandeln. Im Falle von Succinylbischolin ist hierzu eine 2fache Äthylierung nötig. Die Tatsache, daß der neuromuskuläre Block durch Decamethonium nicht in allen Fällen durch Depolarisation verursacht ist, spricht nicht gegen eine prinzipielle Trennung der beiden zum Block führenden Mechanismen. Es wäre aber wohl vorteilhaft, bei theoretischen Erörterungen über das Zustandekommen des neuromuskulären Blocks nicht Decamethonium und curarisierende Stoffe, sondern Succinylbischolin und curarisierende Stoffe gegenüberzustellen; denn Succinylbischolin ist in seiner Wirkungsweise als depolarisierendes „Endplatten-Katelektrotonicum" viel besser als Decamethonium zu übersehen.

Nach der heute gültigen Auffassung verdrängen die curarisierenden Stoffe das an den Endplatten bei Nervenreizung freigesetzte Acetylcholin. Auch diese Vorstellung wird durch unsere Modellversuche gestützt: Tatsächlich gehört Acetylcholin zu den besonders locker adsorbierten Substanzen, die sich noch rascher als Succinylbischolin von der Membran lösen (vgl. Abb. 4). Die physikalisch-chemischen Voraussetzungen für eine adsorptive Verdrängung durch die stark haftenden Substanzen vom Curaretyp sind demnach gegeben. Darüber hinaus ist zu diskutieren, ob nicht die curarisierenden Stoffe durch direkte Stabilisierung des Membranpotentials in der Endplattenregion der Depolarisation entgegenwirken. Zahlreiche andere Alkaloidbasen mit hoher Affinität zur Kollodiummembran (Acetylcholin-Antagonisten, Sympatholytica, Antihistaminica, Lokalanaesthetica) scheinen nämlich — neben der spezifischen Verdrängung des erregenden „Agonisten" — auch solche unspezifisch erregungshemmenden Eigenschaften zu besitzen, die sich vermutlich durch eine Reduktion der Kationenpermeabilität der Membran erklären. Über die Membranwirkungen dieser Stoffe und die damit zusammenhängenden pharmakologischen Grundprobleme ist kürzlich von Eichholtz (1953, 1954) berichtet worden.

Zusammenfassung.

1. Bei fortlaufender elektrischer Messung der Adsorption zeigen erregende, *depolarisierende* Alkaloidkationen („Agonisten") an den negativen „Receptoren" der Kollodiummembran gewöhnlich nur eine geringe Haftfestigkeit. Alkaloidkationen mit *depolarisationshemmender* Wirkung („Antagonisten") werden dagegen meist fester adsorbiert.

2. Die gleiche Regel trifft nach den vorliegenden Untersuchungen auch für die Alkaloidbasen mit spezifischen Endplatteneffekten zu: Succinylbischolin, Adipinbischolin und ihre Monoäthylderivate hemmen die neuromuskuläre Erregungsübertragung durch Depolarisation der Endplattenregion. Diese Stoffe werden von der Kollodiummembran relativ locker gebunden. Die 2fach und 3fach äthylierten Derivate von Succinylbischolin und Adipinbischolin führen dagegen — ähnlich wie Curare und Flaxedil — durch Hemmung der Depolarisation, d. h. des Endplattenstroms zum Block. Diesem Wirkungsumschlag geht eine erhebliche Zunahme der Haftfestigkeit parallel.

3. Decamethonium steht — beurteilt nach seiner Adsorbierbarkeit und nach seinen biologischen Eigenschaften — hart an der Grenze zwischen beiden Gruppen. Einfache Äthylierung genügt hier, um die Haftfestigkeit an der Kollodiummembran bis zu einem — für die depolarisationshemmenden Stoffe charakteristischen — Grade zu steigern. Flaxedil weist besonders starke Affinitäten zur Kollodiummembran auf.

4. Ordnet man die geprüften Alkaloidbasen nach ihrer wachsenden Haftfestigkeit, so stehen die depolarisierenden am Anfang, die ausgesprochen depolarisationshemmenden am Ende. Diese Stellung in der natürlichen Adsorptionsreihe macht den in vivo beobachteten Antagonismus der stark haftenden depolarisationshemmenden Verbindungen gegen die locker adsorbierten Stoffe verständlich: Auch in vivo scheint meist dasjenige Alkaloidkation im Kampf um den gemeinsamen Membranreceptor zu dominieren, das schon an der toten Kollodiummembran die höheren Adsorptionsaffinitäten erkennen läßt.

Literatur.

Bovet, D., F. Bovet-Nitti, S. Guarino, V. G. Longo et R. Fusco: Recherches sur les poisons curarisents de synthèse III. Arch. internat. Pharmacodynamie **88**, 1—50 (1951). — Brown, G. L., W. D. M. Paton and M. V. Dias: The depression of the demarcation potential of cat's tibialis by bistrimethylammonium decane diiodide (C_{10}). Brit. J. Physiol. **108**, 15 P (1949). — Burns, B. D.,and W. D. M. Paton: Depolarization of the motor end-plate by decamethonium and acetylcholine. Brit. J. Physiol. **115**, 41—73 (1951). — Castillo, J. C., and E. J. de Beer: The neuromuscular blocking action of succinyl-choline (diacetylcholine). J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **99**, 458—464 (1950). — Eichholtz, F.: Zur Pharmakologie des autonomen Nervensystems. Arch. Ohr- usw. Heilk. u. Z. Hals- usw. Heilk. **163**. 98—139 (1953). — Fleckenstein, A.: Über den primären Energiespeicher der

Muskelkontraktion. Pflügers Arch. **250**, 658 (1948). — Die periphere Schmerzauslösung und Schmerzausschaltung. Frankfurt/Main: Steinkopff (1950a). – Über den Wirkungsmechanismus der Lokalanaesthetica. Klin. Wschr. **1950** b, 452—453. — Korreferat: „Kalium-Sensibilisatoren." Verh. Deutsch-Pharmakol. Ges. 17. Tgg., Bad Nauheim April 1950; s. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **212**, 54—64 (1950c). – Elektrophysiologische Studien zum Mechanismus des Nervenblocks durch Schmerzstoffe und Lokalanaesthetica. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **212**, 416—432 (1951). — Fleckenstein, A., H. Günther u. H. J. Winker: Adsorption und Haftfestigkeit pharmakologisch aktiver Alkaloidkationen an der Kollodiummembran. Physikalisch-chemische Grundversuche zur „competitive inhibition". Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **214**, 38—54 (1951). — Fleckenstein, A., u. A. Hardt: Der Wirkungsmechanismus der Lokalanaesthetica und Antihistaminkörper — ein Permeabilitätsproblem. Klin. Wschr. **1949**, 360—363. — Fleckenstein, A., H. Hille u. W. E. Adam: Aufhebung der Kontrakturwirkung depolarisierender Katelektrotonica durch Repolarisation im Anelektrotonus. Die Anode als Antagonist von Acetylcholin, Cholin, Nicotin, Coniin, Veratrin, Kalium- und Rubidium-Salzen usw. Pflügers Arch. **253**, 264—282 (1951). — Ginzel, K. H., H. Klupp u. G. Werner: Die Wirkungsweise einiger γ, ω-bis-quaternärer Ammoniumverbindungen an der Skeletmuskulatur. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 103—118 (1952). — Paton, W. D. M., and E. J. Zaimis: The pharmacological actions of polymethylene bistrimethylammonium salts. Brit. J. Pharmacol. **4**, 381—400 (1949). — The methonium compounds. Pharmacol. Rev. **4**, 219—253 (1952). — Philippot, E., et M. J. Dallemagne: Les inhibiteurs de la transmission neuromusculaire étudies chez le chien. Experientia (Basel) **8**, 273—274 (1952). — Zaimis, E. J.: The action of decamethonium on normal and denervated mammalian muscle. Brit. J. Physiol. **112**, 176—190 (1951). — Motor end-plate differences as a determining factor in the mode of action of neuro-muscular blocking substances. Brit. J. Physiol. **122**, 238—251 (1953).

Prof. Dr. A. Fleckenstein, Pharmakol. Institut d. Univ. Heidelberg.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 224, S. 496—522 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. F. Eichholtz).

Papierchromatographische Trennungsmethode für die säurelöslichen Phosphorverbindungen aus Nierengewebe* **.

Von
Eckehart Gerlach und Ellen Weber.

Mit 10 Textabbildungen.

(Eingegangen am 5. Oktober 1954.)

Verschiedenartige funktionelle Leistungen in Verbindung mit wichtigen Stoffwechselvorgängen und einem alle anderen Gewebe übertreffenden Energiebedarf weisen auf eine Sonderstellung der Niere unter den übrigen Organen hin. Alle exkretorischen Leistungen, besonders die tubulären Sekretions- und Resorptionsvorgänge und diesen parallel geschaltete Stoffwechselprozesse — Entgiftung körpereigener und exogen zugeführter Stoffe, Aufrechterhaltung ionaler Gleichgewichtszustände, Regulation des Säure-Basen-Haushaltes, Abbau, Trans- und Desaminierung von Aminosäuren — benötigen als gemeinsame Voraussetzung energielieferude Reaktionen. Für die Übertragung und Freisetzung der aus dem intermediären Stoffwechsel gewonnenen Energie stehen dem Organismus verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung, von denen eine, sicherlich sehr wichtige, die Bildung energiereicher Phosphorverbindungen ist. Es kann als wahrscheinlich gelten, daß auch in der Niere eine engere Verknüpfung besteht zwischen Phosphorstoffwechsel einerseits und energieverbrauchenden Stoffwechselvorgängen sowie funktionellen Leistungen andererseits.

Mudge u. Taggart konnten zeigen, daß eine einmalige Gabe von 10 mg Dinitrophenol/kg am Hund die Ausscheidung von p-Aminohippursaure, Phenolrot und Diodrast durch die Nieren blockiert. Aus Untersuchungen von Taggart u. Forster ergab sich weiterhin, daß durch Dinitrophenol der Zelltransport von Phenolrot im gleichen Maße eingeschränkt wird, wie es zu einer Hemmung von Phosphorylierungsvorgängen kommt.

Dinitrophenol führt bekanntlich zu einer Verminderung energiereicher Phosphorverbindungen — besonders von ATP und Kreatinphosphat — und zur Entkopplung von Oxydation und Phosphorylierung. Die Wirkungsweise soll nach Untersuchungen von Witter, Newcomb u. Stotz und Siekevitz u. V. R. Potter

* Herrn Prof. Eichholtz in Verehrung und Dankbarkeit zum 65. Geburtstag gewidmet.

** Auszugsweise vorgetragen am 28. Juni 1954 aus Anlaß des III. Symposion in Freiburg/Brg. und am 5. Oktober 1954 während der 21. Tagung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft in Saarbrücken.

an Organhomogenaten über eine Aktivierung spezifischer Phosphatasen zu erklären sein. Inwieweit diese Erklärung für die Wirkung des Dinitrophenol am lebenden Organismus Gültigkeit hat, bleibt zunächst noch ungeklärt.

Die deutliche Beeinflussung des Exkretionsmechanismus der Niere durch Stoffe, die ihre Wirkung jedenfalls zum Teil über den Phosphorstoffwechsel entfalten, führt zu der Frage nach dem Gehalt der Niere an energiereichen P-Verbindungen. Bei stoffwechselchemischen Untersuchungen, die immer nur ein Momentbild des fortlaufenden Stoffwechselgeschehens wiederzugeben gestatten, werden nicht nur die energiereichen P-Ester erfaßt, sondern daneben eine Vielzahl ihrer Vor- und Abbaustufen, die alle durch fermentgesteuerte Gleichgewichtsreaktionen zueinander in Beziehung stehen. Außerdem ist bei dem Fermentreichtum der Niere zu erwarten, daß die phosphorhaltigen Cofermente mit in die Analyse der P-Verbindungen eingehen. Die quantitative Erfassung möglichst vieler säurelöslicher P-Ester erscheint aber deshalb um so wünschenswerter, als sich vielleicht für einige pharmakologisch interessierende Substanzen der Angriffspunkt an energiereichen und anderen P-Estern ermitteln läßt.

Wohl wegen der großen methodischen Schwierigkeiten bei der gleichzeitigen Bestimmung zahlreicher P-Verbindungen aus Gewebsextrakten finden sich in der Literatur nur wenige Angaben über die Verteilung von P-Estern in der Niere. Mit den älteren, vor allem auf Lohmann, Warburg, v. Euler, Embden u. a. zurückgehenden Methoden (Aufnahme der Hydrolysenkurven; Fällbarkeit von Phosphorverbindungen durch Barium, Schwermetalle, Brucin, Strychnin, Chinin; Bildung gefärbter Komplexe usw.) konnte nur eine unvollständige Aufschlüsselung der säurelöslichen organischen P-Verbindungen erreicht werden. Erst die in jüngerer Zeit eingeführte chromatographische Arbeitsweise mit Ionenaustauschern und die Papierchromatographie haben auch auf diesem Gebiet neue Möglichkeiten geschaffen.

Speziell für die Aufklärung des Phosphorsäurestoffwechsels im tierischen und pflanzlichen Gewebe ausgearbeitete papierchromatographische Methoden (Hanes u. Isherwood; Markham u. Smith; Carter; Bandurski u. Axelrod; Zetterström u. Ljunggreen; Burrows, Grylls u. Harrison; Eggleston u. Hems; Fleckenstein u. Gerlach; Fleckenstein u. Janke; Fleckenstein, Janke, Lechner u. Bauer und viele andere) haben zu einer Überprüfung und wesentlichen Erweiterung der früheren Ergebnisse geführt.

Ziel unserer im folgenden wiedergegebenen Untersuchungen sollte sein:

1. Ausarbeitung einer Methodik, die durch Kombination chemischer und papierchromatographischer Arbeitsweisen eine getrennte Erfassung der Mehrzahl säurelöslicher Phosphorverbindungen aus Nierengewebe gestattet;

2. Ermittlung der normalen Verteilung von organischen Phosphorsäureestern und Orthophosphat im Nierengewebe gesunder Ratten.

Experimenteller Teil.

Für alle Untersuchungen wurden männliche Ratten (Gewicht 180—250 g, Durchschnittsgewichte beider Nieren jeweils 1200—1500 mg) verwendet. Die Nahrung der Tiere bestand aus einem kalorien- und vitaminreichen Mischfutter.

Herstellung des trichloressigsauren Nierenextraktes.

Wegen der Notwendigkeit vergleichbarer Versuchsbedingungen werden die Tiere 18—24 Std ohne Nahrung nur mit ausreichender Wassermenge in einem Wärmeschrank von 22° C gehalten. Dann erfolgt die Tötung durch Dekapitation nach vorausgegangener Nackenschlagbetäubung. Die Nieren, noch in situ dekapsuliert und vom Gefäßbündel und den Ureteren abgeschnitten, kommen innerhalb von 20 –30 sec nach der Dekapitation in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Mörser. Ihr Blutgehalt ist stets gering, da durch die Art der Tötung eine sehr rasche und gründliche Ausblutung des ganzen Tieres erfolgt[1].

Unter mehrfachem Zusatz von flüssigem Stickstoff werden die Nieren zu einem sehr feinen Pulver zerrieben, das in ein mit 10%iger TCS[2] von 0° C beschicktes, vorgewogenes Zentrifugenglas eingefüllt wird. Die angeschlossene Wiederwägung ergibt das Gewicht des zu extrahierenden Gewebspulvers. Eine kleine Menge des zerkleinerten Gewebematerials wird zur Trockengewichtsbestimmung eingewogen und über $CaCl_2$ bei 100° C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Das Nierengewebspulver wird in der 10%igen TCS (4,0 ml für 1000—1500 mg Gewebe) bei 0° C 5 min durch kräftiges Rühren extrahiert, auf — 3 bis — 5° C unter Vermeidung des Ausfrierens abgekühlt und dann 3 min scharf zentrifugiert. Mit der halben Menge 5%iger TCS erfolgt unter gleichen Bedingungen eine Nachextraktion. Die überstehenden Lösungen der beiden Extraktionsvorgänge werden zum TCS-Gesamtnierenextrakt vereinigt. Hiervon zweigen wir 0,5 ml (*Fraktion* 0) zur Bestimmung des säurelöslichen Gesamt-P und für gesonderte papierchromatographische Analyse ab. Kurzfristige Aufbewahrung dieser Fraktion bei — 10 bis — 15° C bis zur Weiterverarbeitung.

Fraktionierung des Nierenextraktes durch Barium-Alkoholfällung.

Voruntersuchungen ergaben, daß eine direkte papierchromatographische Auftrennung aller im TCS-Extrakt enthaltenen P-Verbindungen wegen ihrer Vielzahl und der Ähnlichkeit in den R_f-Werten mit den verschiedensten Lösungsmittelsystemen, sowohl ein-, als auch zweidimensional, nicht zu erreichen war. Eine chemische Vorfraktionierung wurde daher notwendig. Die Bildung schwer- und leichtlöslicher Bariumsalze der Phosphorsäureester wird schon seit Jahren für diese Zwecke ausgenutzt. Wir übernahmen die Standardmethode von Le Page und modifizierten sie dahingehend, daß eine exakte und quantitative Fraktionierung auch mit kleinsten Mengen des Ausgangsmaterials erreicht wurde, und eine ungestörte papierchromatographische Aufarbeitung angeschlossen werden konnte.

Alle Arbeitsgänge der im folgenden in ihren Einzelheiten beschriebenen Methode werden bei Temperaturen zwischen — 5° C und + 2° C ausgeführt.

---

[1] Entfernung der Nieren aus dem mit Äther narkotisierten Tier sowie isolierte Durchströmung der Nieren mit Ringer-Lösung zur Blutfreimachung wurden in Kontrollversuchen durchgeführt; die mit dieser Arbeitsweise erzielten Analysenergebnisse der P-Ester stimmten aber überein mit den unter obigen Bedingungen ermittelten.

[2] TCS: verwendete Abkürzung für Trichloressigsäure.

1. Einstellung des TCS-Gesamtnierenextraktes mit 3 n und 0,3 n KOH auf einen p_H-Wert von 8,2 gegen Phenolphthalein[1]. Zur Vermeidung einer lokalen Überalkalisierung ist dabei ständiges, kräftiges Rühren erforderlich. Es empfiehlt sich ein gelegentliches exaktes Nachmessen des p_H-Wertes, da durch Abweichung von $\pm$ 0,5 p_H-Einheiten zur sauren oder alkalischen Seite die angeschlossene Bariumfraktionierung nicht mehr quantitativ gelingt.

2. Zusatz einer 25%igen Ba-Acetatlösung im Überschuß (nach LE PAGE benötigt theoretisch 1 mg Phosphor zur Fällung 8,2 mg Ba-Acetat oder 0,033 ml einer 25%igen Ba-Acetatlösung; praktisch ist jedoch für die quantitative Ausfällung ein $7^1/_2$facher Überschuß, also etwa 0,25 ml der 25%igen Ba-Acetatlösung/mg Phosphor, erforderlich). 20 min bei 0° C bis zur vollständigen Fällung der schwerlöslichen Ba-P-Ester stehen lassen und dann zentrifugieren. Die überstehende Lösung wird abgetrennt und in der Kälte gehalten.

3. Wegen der nachweislichen, schon von CORI u. CORI beschriebenen Mitfällung einer kleinen Menge der leichtlöslichen Ba-P-Ester in Form ihrer Doppelsalze erfolgt nach Wiederauflösung des Niederschlages in wenig 1 n HCOOH eine Umfällung der schwerlöslichen Ba-P-Ester. Zu diesem Zweck Einstellung der ameisensauren Lösung auf p_H 8,2 (wie oben beschrieben), Zusatz noch einiger Tropfen der 25%igen Ba-Acetatlösung und wieder 20 min stehen lassen. Nach dem Abzentrifugieren werden die überstehenden Lösungen der 1. und 2. Bariumfällung vereinigt und ihr Volumen bestimmt.

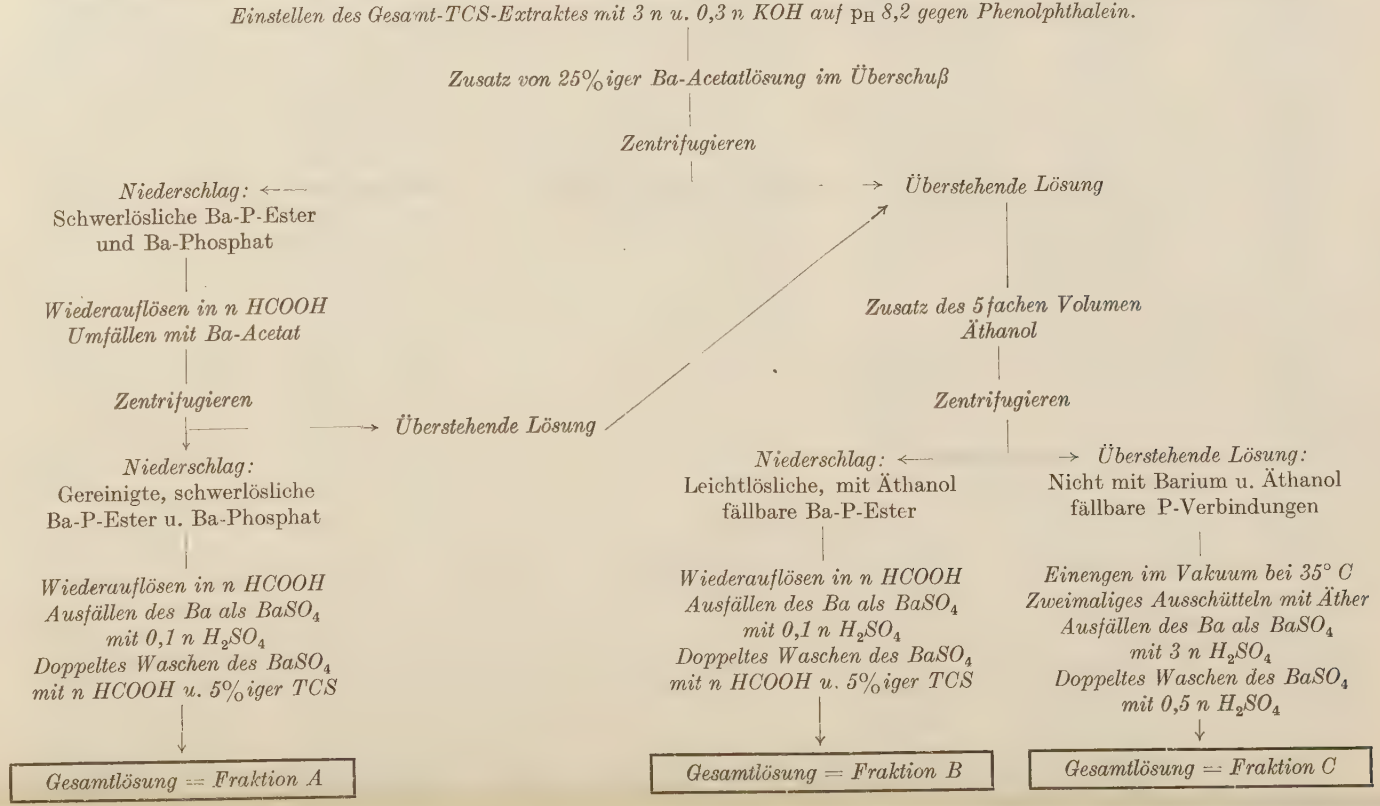
4. Der nunmehr nur noch die schwerlöslichen Ba-P-Ester und Ba-Phosphat enthaltende gelbe Niederschlag wird in ausreichender Menge 1 n Ameisensäure gelöst[2], mit einem minimalen Überschuß von 0,1 n H_2SO_4 zur Ausfällung des Bariums versetzt und abzentrifugiert. (Ein größerer Sulfatüberschuß muß durch Ba-Acetatlösung wieder zurückgefällt werden, da SO_4'' die papierchromatographische Identifizierung einiger P-Ester stören kann; vgl. Fußnote S. 502.) Anschließend zweimaliges gründliches Waschen des $BaSO_4$-Niederschlages mit 1 n Ameisensäure und 5%iger TCS und Vereinigung der Waschflüssigkeiten mit der überstehenden Lösung der $BaSO_4$-Fällung. Diese Gesamtlösung, deren Volumen gemessen wird, enthält die freien Säuren und Alkalisalze der P-Verbindungen, die mit Barium schwerlösliche Salze bilden; wir bezeichnen sie als *Fraktion A* (= bariumunlösliche Fraktion nach LE PAGE). Sie wird sofort papierchromatographisch weiterverarbeitet und ihr Gesamt-P-Gehalt gesondert bestimmt.

5. Die vereinigten überstehenden Lösungen der ersten und zweiten Bariumfällung werden mit dem 5fachen Volumen von reinem 96%igen Äthanol versetzt und anschließend der p_H-Wert mit 0,3 n KOH wieder genau auf 8,2 eingestellt. Diese Lösung bleibt 45 min bei 0° C bis zur vollständigen Ausflockung der leichtlöslichen Ba-P-Ester stehen und wird dann scharf zentrifugiert. Die Auflösung des weißlichgelben Niederschlages in 1 n Ameisensäure, die Ausfällung des Bariums mit 0,1 n H_2SO_4 und das Waschen des $BaSO_4$ erfolgt wie oben für die Fraktion A angegeben. In der so erhaltenen Gesamtlösung, deren Volumen bestimmt wird, liegen die mit

[1] Wegen der durch Flavinderivate bedingten Eigenfärbung des Extraktes ist der Umschlagspunkt durch einen orangen Farbton gekennzeichnet.

[2] Hierbei bleibt regelmäßig eine leichte, zentrifugierbare Trübung zurück. RABINOWITZ u. Mitarb. wiesen kürzlich darauf hin, daß nicht die ganze Menge des mit Barium fällbaren Coenzym A in Säuren wieder löslich ist. Ob in unserem Falle ein Teil der Trübung auf Coenzym A oder Bruchstücke dieses Fermentes zurückgeht, ist noch ungeklärt. Nachgewiesen werden konnte jedoch, daß sie in erster Linie durch $BaSO_4$ bedingt ist; denn dieses entsteht aus dem mit TCS extrahierbaren Sulfat des Nierengewebes und dem zugesetzten Ba-Acetat.

Schematische Übersicht einer fraktionierten Barium-Alkoholfällung von Phosphorsäureestern (nach LE PAGE, modifiziert).


Einstellen des Gesamt-TCS-Extraktes mit 3 n u. 0,3 n KOH auf pH 8,2 gegen Phenolphthalein.
Zusatz von 25%iger Ba-Acetatlösung im Überschuß
Zentrifugieren
Niederschlag: ←
Schwerlösliche Ba-P-Ester und Ba-Phosphat
→ Überstehende Lösung
Wiederauflösen in n HCOOH
Umfällen mit Ba-Acetat
Zentrifugieren
→ Überstehende Lösung
Niederschlag:
Gereinigte, schwerlösliche Ba-P-Ester u. Ba-Phosphat
Wiederauflösen in n HCOOH
Ausfällen des Ba als $BaSO_4$
mit 0,1 n H_2SO_4
Doppeltes Waschen des $BaSO_4$
mit n HCOOH u. 5%iger TCS
Gesamtlösung = Fraktion A
Zusatz des 5fachen Volumen Äthanol
Zentrifugieren
Niederschlag: ←
Leichtlösliche, mit Äthanol fällbare Ba-P-Ester
Wiederauflösen in n HCOOH
Ausfällen des Ba als $BaSO_4$
mit 0,1 n H_2SO_4
Doppeltes Waschen des $BaSO_4$
mit n HCOOH u. 5%iger TCS
Gesamtlösung = Fraktion B
→ Überstehende Lösung:
Nicht mit Barium u. Äthanol fällbare P-Verbindungen
Einengen im Vakuum bei 35° C
Zweimaliges Ausschütteln mit Äther
Ausfällen des Ba als $BaSO_4$
mit 3 n H_2SO_4
Doppeltes Waschen des $BaSO_4$
mit 0,5 n H_2SO_4
Gesamtlösung = Fraktion C

Barium leichtlösliche Salze bildenden P-Verbindungen als freie Säuren und Alkalisalze vor; wir bezeichnen diese Lösung als *Fraktion B* (= bariumlöslich-alkoholunlösliche Fraktion nach LE PAGE). Sie wird bis zur papierchromatographischen Weiterverarbeitung und Bestimmung ihres Gesamt-P-Gehaltes eine Stunde bei — 10 bis — 15° C aufbewahrt.

6. Nach Abtrennung der durch Äthanolzusatz gefällten P-Ester enthält die als *Fraktion C* (= bariumlöslich-alkohollösliche Fraktion nach LE PAGE) bezeichnete überstehende Lösung solche P-Verbindungen, die unter den oben geschilderten Bedingungen nicht zur Ausfällung gebracht werden können. Wegen einiger methodischer Schwierigkeiten wird nach Einengen dieser Fraktion vorerst nur ihr Gesamtgehalt an Phosphor bestimmt.

Verteilung von Phosphorsäureestern auf die Fraktionen A, B und C.

Fraktion A

*Orthophosphat	
*2- u. 3-Phosphoglycerinsäure	PGS
Hexose-1, 6-diphosphat	HDP
*Adenosin-5′-triphosphat	ATP
*Adenosin-5′-diphosphat	ADP
Inosin-5′-triphosphat	ITP
Inosin-5′-diphosphat	IDP
*Triphosphopyridinnucleotid	TPN
*Weitere Nucleotidfraktionen	„NF“
*Flavinadenin-Nucleotide	FAD

Fraktion B

*Kreatinphosphat	Kr-P
*Phospho-enol-brenztraubensäure	PEB
*Triosephosphate (Dioxyaceton-phosphorsäure, Glycerinaldehyd-phosphorsäure und andere)	
Glucose-1-phosphat	G-1-P
*Glucose-6-phosphat	G-6-P
*Fructose-6-phosphat	F-6-P
Ribose-5-phosphat	R-5-P
*Adenosin-5′-monophosphat	5′-AMP
Adenosin-3′(bzw. 2′)-monophosphat	3′-AMP
*Inosin-5′-monophosphat	IMP
*Cytidin-5′-monophosphat	CMP
Guanosin-5′-monophosphat	GMP
Uridin-5′-monophosphat	UMP
*Diphosphopyridinnucleotid	DPN
*Weitere Nucleotidfraktionen	„NF“
*Flavinderivate	

Fraktion C

*1,2-Propandiolphosphat
*Amino-äthylphosphat
*Weitere unbekannte P-Verbindungen.

Mit * gekennzeichnete Verbindungen kommen stets in fraktionierten Nierenextrakten vor. Die angegebenen Abkürzungen werden im folgenden für die P-Ester verwendet.

Grundsätzliche Verfahren bei der Papierchromatographie von Phosphorsäureestern.

1. Vorbehandlung der Papiere.

Whatman No. 1-Papiere, Größen 20 × 45 cm, 20 × 55 cm, 35 × 55 cm, werden 45 min in eine 0,5%ige wäßrige Lösung von äthylendiamintetraessigsaurem Natrium (p_H 8,5) eingelegt und anschließend 6mal gründlich mit Aqua dest. gewaschen. Durch diese Behandlungsweise wird nach Angabe von Eggleston u. Hems der Gehalt an Schwermetallionen und Phosphor im Papier stark reduziert. Nach unseren eigenen Ergebnissen enthalten vorgewaschene Papiere nur noch $^1/_{10}$ des in unbehandelten Papieren vorhandenen Phosphors.

2. Auftropfen der Lösungen.

Die eisgekühlten Lösungen der chromatographisch aufzuarbeitenden Fraktionen werden mit Agla-Mikrometerspritzen in Tropfen von 5 μl punktförmig übereinander an der Startlinie aufgetragen und im Kaltluftstrom von 2 Föhnen getrocknet. Zur quantitativen Vergleichsbestimmung werden die Startpunkte stets doppelt angelegt. Anhaltspunkte für die jeweils aufzutragenden Mengen ergeben sich aus der Bestimmung des Phosphorgehaltes der einzelnen Fraktionen. Um optimale Trenneffekte zu erzielen, soll ein Startpunkt nicht mehr als 10—12 γ Phosphor enthalten.

3. Lokalisation und Entwicklung von Nucleotiden und anderen Phosphorverbindungen.

Die Lokalisation der Nucleotide erfolgt nach dem Photoprintverfahren (Markham u. Smith) bei 260 mμ. Zur Sichtbarmachung aller P-haltigen Areale werden die trockenen Chromatogramme mit dem Molybdatreagens von Hanes u. Isherwood (25 ml 4%ige wäßrige Lösung von Ammoniummolybdat + 5 ml 60%ige $HClO_4$ + 10 ml 1 n HCl + 60 ml H_2O) besprayt, 7 min bei 85° C gehalten und dann nach der Methode von Bandurski u. Axelrod mit ungefiltertem UV-Licht einer Quecksilberdampflampe 10—15 min bestrahlt. Durch beschleunigte Reduktion von Molybdän^{VI} unter Bildung von Molybdänblau an allen P-haltigen Stellen erscheinen diese tiefblau gefärbt auf weißem Grund[1].

4. Identifizierung der verschiedenen Phosphorverbindungen.

Orthophosphat bildet sofort nach dem Besprayen mit Molybdatreagens Ammoniumphosphormolybdat, das als gelber Fleck auf dem Papier sichtbar wird. Leicht hydrolysierbare P-Verbindungen spalten während der Trocknung der Chromatogramme bei 85° C in 7 min soviel Orthophosphat ab, daß nach dieser Zeit auch Areale mit Kr-P, G-1-P, ATP und ADP als gelbgefärbte Stellen erkennbar sind.

Für die allgemeine Unterscheidung *leicht- oder schwerhydrolysierbarer P-Ester* dient der Ammoniak-Resistenz-Test (Fleckenstein, Gerlach u. Janke). Das aus den leichthydrolysierbaren Estern abgespaltene Orthophosphat gibt eine gegen Ammoniak resistente Blaufärbung mit Molybdat (Salzbildung), während die schwerhydrolysierbaren Verbindungen, die in 7 min nur wenig oder kein Phosphat

[1] Sulfat-Ionen in einer Konzentration von 0,5—1 γ/cm² geben unter denselben Bedingungen mit dem Ammoniummolybdat-Reagens und anschließender UV-Bestrahlung eine gegen Ammoniak beständige intensive Blaufärbung an den betreffenden Stellen der Chromatogramme. Dies ist zu beachten, wenn für papierchromatographische Untersuchungen Ba-Salze der P-Ester durch H_2SO_4 oder Sulfate in die freien Säuren oder Alkalisalze umgewandelt werden.

abspalten, eine durch Ammoniak auslöschbare Blaufärbung mit Molybdat zeigen (lockere Anlagerung des Molybdäns an esterartig gebundenes Phosphat).

Die Identifizierung von *Kreatinphosphat* auf dem Papier gelingt einfach nach der von Williams für die Erkennung von Kreatin und Kreatinin beschriebenen Methode. Besprayen der Chromatogramme mit einer 1,3%igen Lösung von Pikrinsäure in 96%igem Äthanol, 1 Std zur Umwandlung von Kreatin in Kreatinin bei 100—110° C halten, und neuerliches Sprayen mit einer 1 n NaOH-Lösung, wobei die charakteristische Orangefärbung des Kreatinins erscheint.

Phosphorylierte Pentosen und Hexosen werden mit den aus der Zucker-Chromatographie bekannten Reagenzien identifiziert. Wir verwenden als Sprayreagenzien:

1. Anilinphthalat nach Partridge (1,66 g Phthalsäure + 0,93 g Anilin, gelöst in 100,0 ml H_2O-gesättigtem n-Butanol).

2. m-Phenylendiamin nach Chargaff, modifiziert nach Chernick (0,2% m-Phenylendiamin-dichlorhydrat und 2% Oxalsäure · $2H_2O$ in 96%igem Äthanol).

3. Benzidin nach Horrocks (0,5 g Benzidin + 20 ml Eisessig + 80 ml 96%iges Äthanol).

4. Naphthoresorcin nach Isherwood (gleiche Teile einer 0,2%igen Lösung von Naphthoresorcin in 96%igem Äthanol und einer 2%igen wäßrigen Lösung von Trichloressigsäure werden unmittelbar vor der Anwendung gemischt).

Die für die einzelnen Zucker-P-Ester charakteristischen Farbreaktionen erscheinen auf den besprayten Chromatogrammen nach 10—15 min Trocknung bei 100—110° C. Im Anschluß an die Zuckerreaktionen — besonders nach Anwendung von Anilinphthalat — kann mit Molybdatreagens zur Sichtbarmachung der Phosphorareale erneut gesprayt werden.

Für die allgemeine Erkennung von *Polyhydroxylverbindungen* eignet sich ein von Hockenhull angegebenes Sprayreagens: 1 Teil 0,05 n Natriumboratlösung vom p_H 8,1, 2 Teile Phenolrotlösung (2 mg Phenolrot/ml Äthanol, mit NaOH eben alkalisch gestellt), 7 Teile Methanol. Wir benutzen dieses Reagens, um die Triosekomponente der Triosephosphate und andere Zucker-P-Ester in den Chromatogrammen als helle Flecke auf weinrotem Grund darzustellen.

Zur Erkennung und Identifizierung von *Nucleotiden* dienen:

1. die UV-Photographie bei 260 mμ nach dem Photoprintverfahren;

2. die R_f-Werte dieser Substanzen in bekannten und neuen Lösungsmitteln im Vergleich zu reinen Testsubstanzen[1] und definierten Nucleotidgemischen;

3. die sogenannte „Mischchromatographie" (Zusatz eines bekannten Nucleotids in bestimmter Konzentration zu der zu chromatographierenden Lösung und quantitative Auswertung des fertigen Chromatogramms).

Schwefelhaltige Verbindungen werden mit den aus der Aminosäure-Chromatographie bekannten Farbreaktionen nachgewiesen. Für unsere Zwecke eignen sich besonders:

1. Natrium-Nitroprussid als „dipping"-Reagens nach Toennies u. Kolb (Reagens I: 1,5 g Na-Nitroprussid gelöst in 5 ml 2 n H_2SO_4 + 95 ml Methanol + 10 ml 25%ig. Ammoniak, filtrieren und in der Kälte aufbewahren; Reagens II: 2 g NaCN oder KCN, gelöst in 5 ml H_2O + 95 ml Methanol).

2. Jod-Azid-Reaktion nach Chargaff, Levin u. Green. Die Chromatogramme werden besprayt mit einer 0,05 n wäßrigen Jodlösung, die 1,5% Natriumazid enthält.

Bei der Erfassung von SH-, S-S- oder anderen leicht spaltbaren S-Bindungen geben wir der Nitroprussid-Reaktion ihrer größeren Empfindlichkeit wegen den Vorzug gegenüber der Jod-Azid-Reaktion.

[1] Ein Verzeichnis aller verwendeten Testsubstanzen findet sich am Schluß der Arbeit.

5. Quantitative Bestimmung der Phosphorverbindungen.

Alle P-haltigen Areale werden ausgeschnitten, mit 0,5—0,8 ml Veraschungsreagens (3 Teile 98%ige H_2SO_4 + 2 Teile 60%ige $HClO_4$) feucht verascht und der P-Gehalt nach der Methode von Berenblum u. Chain elektrophotometrisch (Elko II, Zeiss Opton, Filter S 75, Wellenlänge 750 mμ) bestimmt[1]. Von diesen Werten wird der Phosphorgehalt des Papieres selbst — er beträgt durchschnittlich in allen, auch den 2-dimensionalen Chromatogrammen, 0,005 –0,01 γ P/cm^2 — entsprechend den ausgeschnittenen Arealgrößen abgezogen; hierdurch gelangt man zu dem wirklichen P-Gehalt der erfaßten Verbindungen.

Spezielles Verfahren zur papierchromatographischen Aufarbeitung fraktionierter Nierenextrakte.

1. Verwendete Lösungsmittel (Gerlach, Weber u. Döring).

I. 30 ml Diisopropyläther,
30 ml n-Butanol,
20 ml Ameisensäure (98—100%ig).

II. 45 ml Methyl-äthyl-keton oder Diisopropyläther,
25 ml wassergesättigtes n-Butanol,
5 ml n-Propanol,
20 ml Ameisensäure (98—100%ig).

III. 15 ml 30%ige Trichloressigsäure,
25 ml 80%ige Ameisensäure,
40 ml n-Butanol,
20 ml n-Propanol,
25 ml Aceton.

IV. 25 ml n-Propanol,
35 ml n-Butanol,
35 ml Ammoniak (25%ig),
10 ml Wasser.

oder:

15 ml Äthanol,
10 ml n-Propanol,
35 ml n-Butanol,
35 ml Ammoniak (25%ig),
10 ml Wasser.

2. Papierchromatographie der Fraktionen O, A und B.

Fraktion O. Der als Fraktion O bezeichnete unveränderte Teil des TCS-Gesamtnierenextraktes wird auf Papierbogen 20 × 45 cm mit Lösungsmittel I bei 20° C „absteigend" 2 × 18 Std chromatographiert. Sämtliche Nucleotide verbleiben an der Startlinie oder lokalisieren sich dicht oberhalb davon, während alle anderen P-Ester des Gesamtextraktes mehr oder weniger weite Strecken auf dem Papier zurücklegen,

[1] Da bei dieser Methode die Überführung des Ammonium-Phosphormolybdats in Isobutylalkohol quantitativ nur bei einer Konzentration von 0,05—1,5 n H_2SO_4 gelingt, darf die Veraschungsreagensmenge 0,8 ml nicht überschreiten. Gegebenenfalls muß bei Veraschung größerer Areale mit mehr Veraschungsreagens ein entsprechend höherer Wasserzusatz erfolgen.

ohne jedoch quantitativ voneinander abtrennbar zu sein. Lediglich Orthophosphat mit dem größten R_f-Wert in diesem Lösungsmittel wandert den übrigen Verbindungen soweit voraus, daß es absolut sicher isoliert erfaßt werden kann. Dieses Orthophosphat setzt sich aber zusammen aus dem im TCS-Gesamtextrakt enthaltenen freien Orthophosphat und dem aus Kr-P durch Einwirkung des sauren Lösungsmittels hydrolytisch abgespaltenen, so daß wir hier besser von „Orthophosphat + Kreatinphosphat" sprechen.

Eine gemeinsame exakte Erfassung dieser beiden Verbindungen im unveränderten Nierenextrakt ist besonders wichtig. Nach der fraktionierten Fällung müssen die Werte für Orthophosphat aus Fraktion A und Kr-P aus Fraktion B addiert übereinstimmen mit den aus Fraktion O ermittelten für „Orthophosphat + Kreatinphosphat". Diese Übereinstimmung kann als Maß für die Exaktheit der Fällungsbedingungen gelten; denn würde bei dieser chemischen Vorfraktionierung aus labilen P-Estern Orthophosphat abgespalten, so müßte sich der aus den Fraktionen A und B bestimmte Additionswert für Orthophosphat und Kr-P gegenüber dem aus Fraktion O ermittelten nachweislich erhöht haben, was aber bei unserer Arbeitsweise nicht vorkommt. Tatsächlich liegt der Additionswert stets tiefer als der direkt im TCS-Extrakt bestimmte; diese Differenz erklärt sich aus einem durchschnittlichen Verlust von 9,4% bei den Fällungsvorgängen.

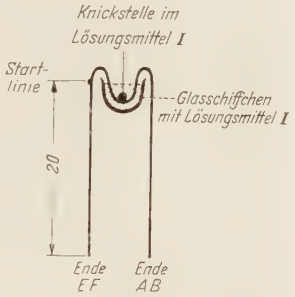
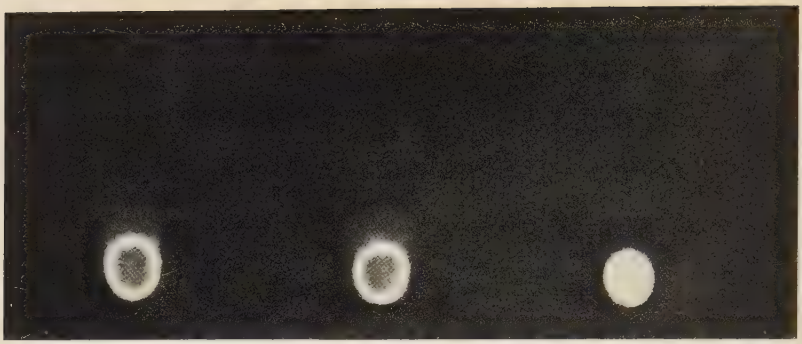


Abb. 1. Anwendung von Lösungsmittel I „absteigend". Zur Auftrennung der Nucleotide in der Fraktion A wird das Ende EF des Papieres mit Orthophosphat und PGS in ca. 5 cm Entfernung von der Startlinie abgeschnitten und Lösungsmittel IV „absteigend" in Richtung auf das Ende AB des Chromatogrammbogens angewendet.

Fraktion A. Die Papierchromatographie der Fraktion A erfolgt auf Papierbogen der Größen 20 × 55 cm. Zur Trennung des Orthophosphats und der 2- und 3-PGS von den Nucleotiden wird Lösungsmittel II bei 20° C „aufsteigend" 16 Std oder — bei stärkerer Anreicherung der Fraktion A auf dem Papier — Lösungsmittel I bei 20° C „absteigend" 8—12 Std angewendet. Für die aufsteigende Chromatographie übernahmen wir die von Fleckenstein u. Gerlach angegebene Methodik (vgl. hierzu Abb. 1 und 2: dieses Arch. **219**, 534; 1953): unsere Abb. 1 zeigt ihre sinngemäße Übertragung auf die absteigende Chromatographie.

Während Orthophosphat in dieser Anordnung „auf- bzw. absteigend" gegen das Ende EF des Papieres von der Startlinie etwa 12 bzw. 22 cm fortwandert, lokalisiert sich PGS ungefähr auf halbem Weg zwischen Startlinie und Orthophosphat. An der Startlinie selbst bleiben die Nucleotide der Fraktion A scharf begrenzt zurück (vgl. Abb. 2). Lediglich ein Teil der mit Barium fällbaren Flavinderivate wandert 2—3 cm von der Startlinie fort.



Fraktion A Testfleck von ATP + ADP

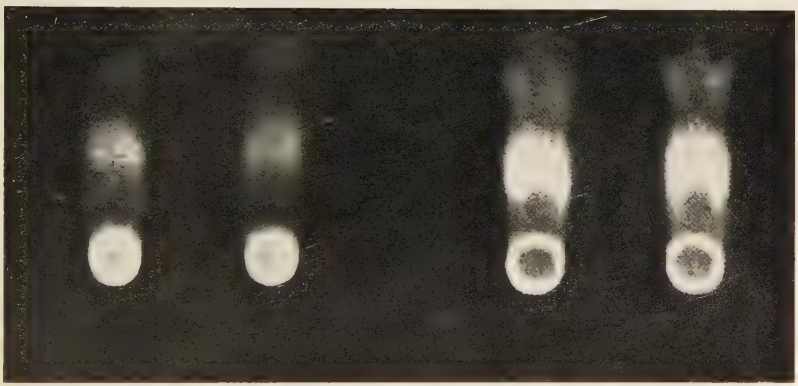
Abb. 2. UV-Photographie der mit Lösungsmittel II (bzw. I) chromatographierten Fraktion A. Die Nucleotide dieser Fraktion sowie ein Testfleck von ADP + ATP bleiben scharf begrenzt an der Startlinie zurück. Der Pfeil zeigt in dieser und den folgenden Abbildungen die Laufrichtung des Lösungsmittels an.

Fraktion A Testflecke von ATP + ADP

Abb. 3. UV-Photographie der Fraktion A nach Anwendung von Lösungsmittel II (bzw. I) und Lösungsmittel IV. Die Nucleotide haben sich in 4 Fraktionen (ADP, ATP, NF_I und NF_{II}) aufgeteilt.

Nach der Anwendung von Lösungsmittel II bzw. I und 1stündiger Zwischentrocknung (Zimmertemperatur) wird Teil CDEF des Papieres mit Orthophosphat und PGS parallel zur Startlinie in 5 cm Abstand davon abgeschnitten.

Zur Auftrennung der Nucleotide wird nunmehr Lösungsmittel IV bei 26° C „absteigend" 2mal nacheinander je 24 Std am Teil ABCD so angewendet, daß diese Verbindungen von der Startlinie auf das Ende AB des Chromatogrammbogens zuwandern, wobei sie sich in einem Teil des Papieres lokalisieren, der noch nicht von P-Verbindungen durchwandert ist. In dieser Anordnung lassen sich 4 Nucleotid-Fraktionen getrennt erfassen. ADP lokalisiert sich am weitesten vorn, dahinter ATP und



Fraktion O Fraktion B

Abb. 4. UV-Photographie der gemeinsam mit Lösungsmittel I „absteigend" chromatographierten Fraktionen O und B. Die Nucleotide dieser Fraktionen lokalisieren sich an und in geringem Abstand von der Startlinie. Die Fraktion B wurde stärker auf dem Papier angereichert.

noch mehr zurückbleibend 2 weitere Nucleotide, NF_I und NF_{II} (vgl. Abb. 3).

Fraktion B. Für die saubere Auftrennung der zahlreichen Bestandteile dieser Fraktion müssen verschiedene Arbeitsgänge durchgeführt werden.

1. Die Erfassung von Kr-P, Triosephosphaten und 2 weiteren, noch nicht identifizierten Verbindungen (Verbindung X und X_1) gelingt am einfachsten durch 2malige Anwendung von Lösungsmittel I bei 20° C „absteigend" je 18 Std. Zu diesem Zweck wird die Fraktion B neben der Fraktion O auf die gleichen Papierbogen aufgetragen und beide Fraktionen gemeinsam chromatographiert.

Da Kr-P in der Fraktion B durch die Einwirkung des sauren Lösungsmittels seine Phosphatkomponente abspaltet, erfassen wir es als Orthophosphat, das allen anderen Verbindungen dieser Fraktion weit vorauswandert. Der Kreatinrest bewegt sich noch etwas rascher vorwärts und

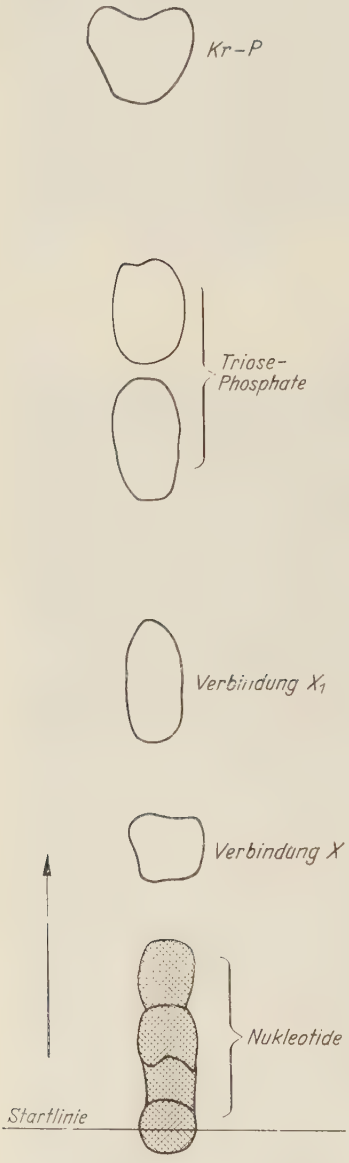


Abb. 5. Originalgetreue Chromatogrammpause, aus der die Position einiger getrennt erfaßbarer P-Verbindungen (Kr-P, 2 Triosephosphatfraktionen, Verbindung X_1 und Verbindung X) nach Anwendung von Lösungsmittel I „absteigend" ersichtlich wird. Die Nucleotide verbleiben gemeinsam in Startliniennähe.

kann mit dem Pikrinsäurereagens nach Williams vor dem Orthophosphat sichtbar gemacht werden. Die Triosephosphate, deutlich in 2 Komponenten getrennt, lokalisieren sich hinter dem Orthophosphat in 5 bzw. 8 cm Abstand. Noch weiter zurück bleibt die Verbindung X_1. Zwischen die in der Nähe der Startlinie verbleibenden Nucleotide (vgl. Abb. 4) und Verbindung X_1 setzt sich, gut abgetrennt, Verbindung X. Als Pause eines solchen Chromatogramms zeigt Abb. 5 die Position der genannten Verbindungen.

2. Alle in der Fraktion B vorkommenden Nucleotide und einige weitere P-Ester werden durch 2-dimensionale Chromatographie getrennt erfaßt. 4 Papierbogen der Größe 35 × 55 cm mit je einem Startpunkt in 6 cm Abstand vom unteren und seitlichen Rand werden mit Lösungsmittel III bei 20° C 2mal nacheinander je 18 Std „aufsteigend" chromatographiert. Die Abb. 6 zeigt die UV-Photographie der vorgetrennten Nucleotide; in Abb. 7, einer Pause eines solchen Chromatogrammes, ist die Position aller P-Verbindungen dargestellt.

Noch nicht eindeutig identifizierte Nucleotide dieser Fraktion sind als NF_{III}, NF_{IV}, NF_V und NF_{VI} bezeichnet. „S + P"-Verbindungen sind solche, die nachweislich Schwefel und Phosphor enthalten.

Nach der Vortrennung mit Lösungsmittel III erfolgt die 2-dimensionale Chromatographie. Hierfür werden die Chromatogrammbogen in Höhe des Startpunktes und 20 cm oberhalb davon abgeschnitten, so daß sie jetzt die Maße 20 × 35 cm haben (vgl. die Schnittlinien in Abb. 7). Bei 2 solchen Bogen kommt Lösungsmittel I (18 Std

bei 20° C), bei den beiden anderen Lösungsmittel IV (2 mal 24 Std bei 26° C) jeweils „absteigend“ in der neuen Längsrichtung der Papiere

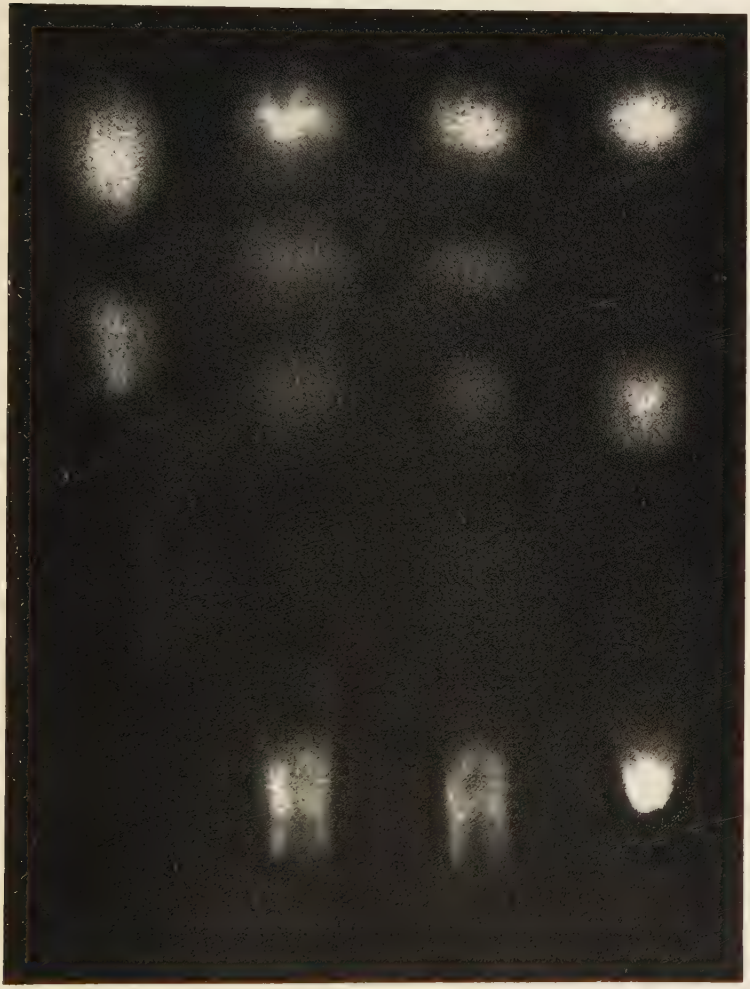


Abb. 6. UV-Photographie der mit Lösungsmittel III „aufsteigend“ vorgetrennten Nucleotide der Fraktion B. Mitchromatographierte Testsubstanzen: GMP, CMP, 5′-AMP, IMP und DPN.

zur Anwendung. Dadurch gelingt die gewünschte Trennung aller erfaßbaren P-Verbindungen.

Wie die Abb. 8, eine Chromatogrammpause, zeigt, trennt das saure Lösungsmittel I besonders gut Verbindung X vom AMP und Nucleotid NF_{III}. Alle anderen Nucleotide und P-Ester (CMP, IMP, NF_{IV}, NF_{V}, DPN, NF_{VI}, G-6-P, F-6-P) und

die „S + P"-Verbindungen werden mit dem ammnoiakalischen Lösungsmittel IV so weit aufgetrennt, daß ihre isolierte Erfassung ohne Schwierigkeiten gelingt, wie aus Abb. 9, dem Ausschnitt einer UV-Photographie, und Abb. 10, der entsprechenden Pause eines fertigen 2-dimensionalen Chromatogrammes, ersichtlich ist.

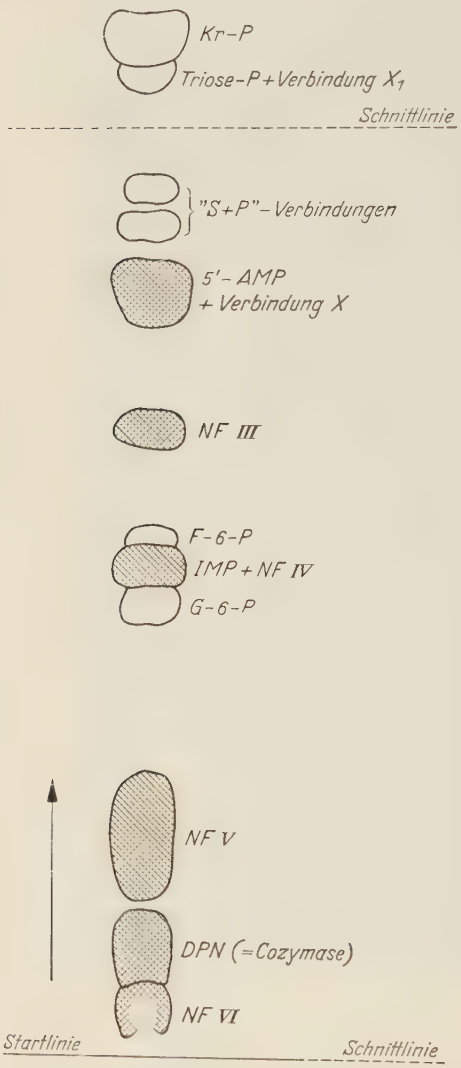


Abb. 7. Originalgetreue Chromatogrammpause, aus der die Position aller in Fraktion B vorkommenden P-Verbindungen nach der Anwendung von Lösungsmittel III „aufsteigend" hervorgeht. Da nur eine unvollständige Trennung der meisten dieser Verbindungen zu erreichen ist, muß der zwischen den beiden Schnittlinien gelegene Teil des Papieres anschließend 2-dimensional chromatographiert werden.

Zur Beurteilung der kombinierten Arbeitsmethoden.

Bei Prüfung der Originalfällungsmethode nach le Page an Erythrocytenextrakten fanden wir eine geringe Zunahme des Orthophosphatgehaltes nach der Fraktionierung gegenüber dem im TCS-Extrakt direkt bestimmten Wert für Orthophosphat. Erythrocytenextrakte mit ihrem außerordentlich geringen Gehalt an freiem Orthophosphat bei recht großen Mengen labiler P-Ester (Fleckenstein u. Gerlach) eigneten sich für diese Kontrolluntersuchungen besonders gut. Nachdem zur Wiederauflösung der Fraktionsniederschläge nicht mehr HCl, sondern die schonendere Ameisensäure verwendet wurde, ließ sich keine Phosphatabspaltung während der Fraktionierung mehr nachweisen.

Die Frage nach der quantitativen Fällbarkeit der Bestandteile der einzelnen Fraktionen wurde an Erythrocyten- und Nierengewebsextrakten genau überprüft. Dabei ergaben sich als absolute Vorbedingungen für die Exaktheit der Fraktionierung:

a) der p_H-Wert von 8,2 muß genauestens eingestellt

werden, da geringe Abweichungen zur sauren oder alkalischen Seite fast stets zur vorzeitigen oder verspäteten Ausfällung einiger P-Verbindungen führen;

b) nach Zusatz von Barium bzw. Äthanol dürfen die Niederschläge frühestens 20 bzw. 45 min später abgetrennt werden, da erst nach dieser Zeit eine vollständige Ausfällung gewährleistet ist.

Die Abtrennung der Bestandteile der Fraktion A von denen der Fraktionen B und C gelingt bei Einhaltung der geschilderten Bedingungen ohne Schwierigkeiten.

Jedoch genügt z. B. eine geringe Abweichung vom p_H-Wert zur alkalischen Seite, um die Mitfällung einer kleinen Menge von AMP in der Fraktion A zu bewirken. Dies ist ohne weiteres an den UV-Photographien der chromatographierten Fraktion A erkennbar, da sich das AMP — entsprechend seiner größeren Wanderungsgeschwindigkeit — vor den anderen Nucleotiden an einer Stelle im Chromatogramm lokalisiert, die unter normalen Bedingungen keine UV-Absorption zeigt.

Von Sacks wurde darauf hingewiesen, daß eine wirklich quantitative Abtrennung der in Fraktion A vorkommenden P-Verbindungen nur durch kombinierte Barium-Calcium-Fällung zu erreichen sei. Wir konnten aber bisher bei der papierchromatographischen Aufarbeitung der Fraktionen A und B keinen Anhaltspunkt für eine solch unvollständige Fällung gewinnen, da nur in sehr wenigen Versuchen zu vernachlässigende Spuren von ATP, ADP und Orthophosphat in der Fraktion B erfaßt wurden. Allgemeingültige Aussagen über die Vollständigkeit einer Fraktionierung können sicher nur mit Vorsicht gemacht werden; denn in Abhängigkeit vom Gehalt eines Gewebsextraktes an mengenmäßig dominierenden Bestandteilen herrschen unterschiedliche Fällungsbedingungen. Zur endgültigen Klärung dieser Verhältnisse werden aber zur Zeit noch weitere Kontrollversuche durchgeführt.

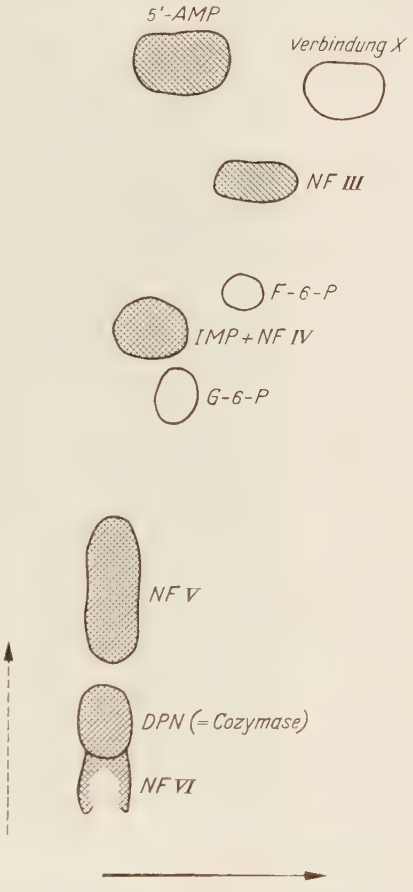


Abb. 5. Originalgetreue Chromatogrammpause, die nach 2-dimensionaler Chromatographie mit Lösungsmittel III (→) und Lösungsmittel I (→) die Abtrennung des AMP von Verbindung X sowie das Verhalten der übrigen P-Verbindungen zeigt.

Auch die Trennung der Bestandteile der Fraktion B von denen der Fraktion C verläuft in Nierenextrakten quantitativ; allerdings ergab

sich die Notwendigkeit, statt des 4fachen das 5fache Volumen Äthanol für die Fällung der leichtlöslichen Ba-P-Ester zuzusetzen. Im Gegensatz zu einer Angabe von le Page konnten wir sicherstellen, daß unter unseren Bedingungen auch DPN quantitativ in der Fraktion B erscheint, denn in der Fraktion C konnte keine Substanz mit UV-absorbierenden Eigenschaften mehr nachgewiesen werden.

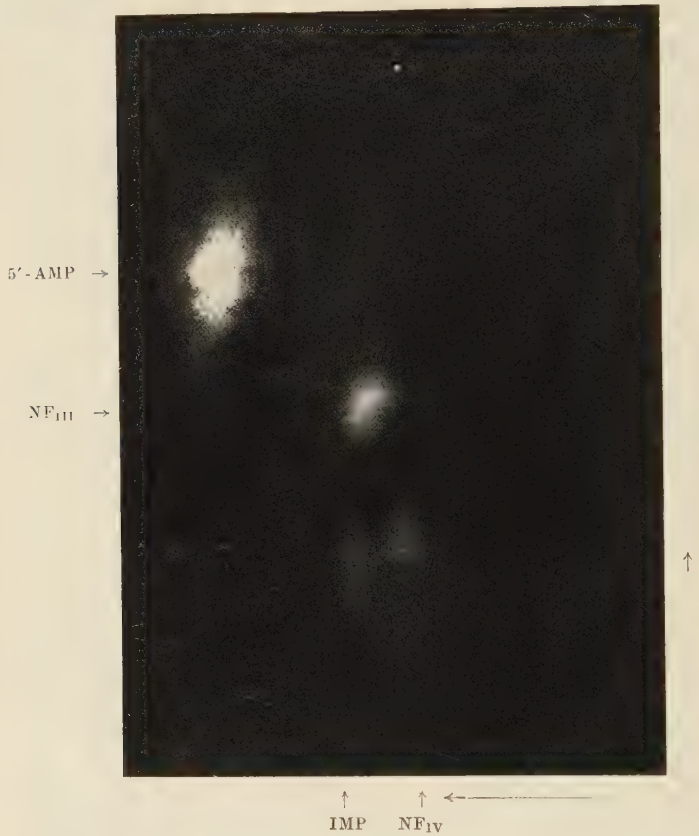


Abb. 9. Ausschnitt aus einer UV-Photographie nach 2-dimensionaler Chromatographie mit Lösungsmittel III (→) und Lösungsmittel IV (→). CMP und NF_{III} sowie IMP und NF_{IV} sind nunmehr voneinander getrennt.

Flavinadeninnucleotide und andere Flavinderivate des TCS-Nierenextraktes verhalten sich bei der fraktionierten Fällung nicht einheitlich. Die Hauptmenge dieser Verbindungen ist zwar mit Barium fällbar und erscheint dementsprechend in der Fraktion A, jedoch wird noch ein kleiner Teil als leichtlösliche Bariumverbindungen in der Fraktion B wiedergefunden. Wegen dieses unterschiedlichen Verhaltens wurde in

unseren Versuchen auf die quantitative Bestimmung der Flavine verzichtet, zumal sich herausstellte, daß nur eine relativ sehr kleine Menge Phosphor auf sie entfällt.

Um zu klären, ob während der zum Teil recht langdauernden Chromatographie in den einzelnen Fraktionen labile P-Ester durch Einwirkung der sauren oder ammoniakalischen Lösungsmittel einen Teil

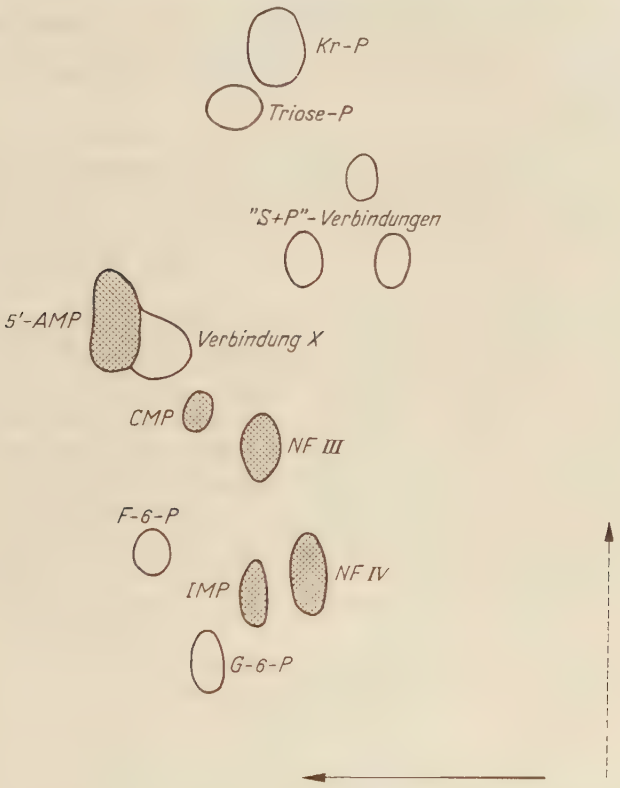


Abb. 10. Originalgetreue Chromatogrammpause, aus der die Position aller aufgetrennten P-Verbindungen der Fraktion B nach 2-dimensionaler Chromatographie mit den Lösungsmitteln III (---→) und IV (→) hervorgeht.

ihres Phosphates hydrolytisch abspalten, wurden die fertigen Chromatogramme zusätzlich mit Lösungsmittel I chromatographiert. Hierdurch konnte geklärt werden, daß keine Verbindung Phosphat abspaltet, da die Areale, an denen sich dieses abgespaltene Orthophosphat lokalisieren würde, bei quantitativer Auswertung den Leerwert des Papieres ergaben. Allerdings dürfen keine Pausen zwischen den einzelnen Chromatographievorgängen eingelegt werden.

Nur Kr-P wird durch Anwendung saurer Lösungsmittel zerstört, worauf bereits hingewiesen wurde. Es war in diesem Zusammenhang wichtig, ob das in Fraktion B erfaßte Orthophosphat, das wir als nur aus Kr-P abgespaltenes ansehen, wirklich allein aus dieser Verbindung entsteht. Immerhin besteht die Möglichkeit, daß noch andere labile P-Ester in der Fraktion B Phosphat abspalten oder daß die Ausfällung des freien Orthophosphates mit Barium nicht quantitativ gelingt, wodurch von vornherein schon eine kleine Menge freien Orthophosphates in der Fraktion B vorhanden wäre. Durch Chromatographie der Fraktion B mit Lösungsmittel IV, in dem Kr-P als intakte Verbindung neben eventuell vorhandenem Orthophosphat erfaßt wird, konnte einwandfrei geklärt werden, daß in dieser Fraktion kein Orthophosphat vorkommt, und die nach Chromatographie mit sauren Lösungsmitteln auftretende Menge an freiem Orthophosphat genau übereinstimmt mit der im Kr-P gebundenen.

Für die Beurteilung der Genauigkeit unserer kombinierten Arbeitsweise war es notwendig, in jedem Versuch den Verlust an P-Verbindungen durch die chemische Vorfraktionierung zu erfassen und bei der Papierchromatographie der Fraktionen A und B zu bestimmen, wieviel Prozent des Gesamt-P-Gehaltes dieser Fraktionen in den isolierten P-Verbindungen wiedergefunden werden.

Die Differenz zwischen dem aus Fraktion O ermittelten säurelöslichen Gesamt-P und dem nach der Fällung in den Fraktionen A, B und C wiedererfaßten Phosphor ergibt in unseren Versuchen einen durchschnittlichen Verlust an P-Verbindungen von 9,4%. Dieser Wert entspricht durchaus dem Verlust, mit dem bei einer chemischen Fraktionierung kleinster Substanzmengen gerechnet werden muß.

Bei der papierchromatographischen Aufarbeitung entfallen auf die getrennt bestimmten P-Verbindungen durchschnittlich in Fraktion A 93,6%, in Fraktion B 91,5% vom jeweiligen Gesamt-P-Gehalt dieser Fraktionen; der Rest von 6,4% bzw. 8,5% wird nicht erfaßt.

Normalverteilung der säurelöslichen P-Verbindungen in Rattennieren.

Tabelle 1.

	γ P/g Feuchtgewicht	γ P/g Trockengewicht	μmol P/g Feuchtgewicht	μmol P/g Trockengewicht
Fraktion O	881	4190	28,4	135,0
Fraktion A	336	1600	10,8	51,6
Fraktion B	324	1542	10,45	49,8
Fraktion C	139	662	4,49	21,3

In der Tabelle sind die aus 20 verschiedenen Versuchen bestimmten Mittelwerte für den P-Gehalt der Fraktionen O, A, B und C getrennt in γ P- und μmol P/g Feucht- und Trockengewicht aufgeführt. Die Werte in der Fraktion O geben den tatsächlichen Gesamtgehalt an säurelöslichem Phosphor im TCS-Nierenextrakt wieder; die übrigen Angaben zeigen die nach der Vorfraktionierung auf die Fraktionen A, B und C

entfallenden P-Mengen, die zusammen im Durchschnitt 90,6% des säurelöslichen Gesamt-P ausmachen.

Es ist jedoch zweckmäßig, als Bezugsbasis lediglich den P-Gehalt dieser 3 Fraktionen als „Gesamt-P_{A+B+C}" mit 100% anzusetzen, da nur von dieser Menge ausgehend eine Aufschlüsselung in die einzelnen P-Verbindungen durchgeführt wird. Somit ergeben sich für die prozentualen Anteile jeder Fraktion am Wert für „Gesamt-P_{A+B+C}": Fraktion A 42,1%, Fraktion B 40,5%, Fraktion C 17,4%.

Tabelle 2.

	% P bezogen auf „Gesamt-P_{A+B+C}"	γ P/g Feuchtgewicht	γ P/g Trockengewicht	μmol/g Feuchtgewicht	μmol/g Trockengewicht	μmol P/g Feuchtgewicht	μmol P/g Trockengewicht
Orthophosphat	29,4	240,0	1135,0	7,75	36,1	—	—
Verbindung X	10,0	78,1	381,0	—	—	2,65	11,7
Adenosin-5′-monophosphat	5,7	44,4	216,0	1,44	7,0	—	—
Diphosphopyridinnucleotid (= Co-Zymase)	5,0	38,1	179,0	0,61	2,8	—	—
Kreatinphosphat	4,5	31,8	153,0	1,02	5,0	—	—
Adenosin-5′-diphosphat . .	3,8	30,4	145,0	0,49	2,4	—	—
Adenosin-5′-triphosphat . .	2,6	23,5	112,0	0,25	1,2	—	—
Nucleotidfraktion „NF_{III}" .	2,1	16,6	78,0	—	—	0,54	2,6
Nucleotidfraktion „NF_{II}" .	2,1	16,6	78,0	—	—	0,54	2,6
Nucleotidfraktion „NF_{VI}" .	2,0	16,2	75,8	—	—	0,52	2,5
Nucleotidfraktion „NF_{V}" .	1,9	15,0	71,2	—	—	0,44	2,1
Verbindung X_1	1,6	11,8	57,2	—	—	0,38	1,9
Glucose-6-phosphat	0,9	7,1	33,8	0,23	1,1	—	—
Fructose-6-phosphat	0,87	7,0	33,6	0,23	1,1	—	—
Nucleotidfraktion „NF_{I}" .	0,87	7,0	33,6	—	—	0,23	1,1
2- und 3-Phosphoglycerinsäure	0,6	5,1	26,8	0,18	0,9	—	—
Inosin-5′-monophosphat . .	0,55	4,3	21,6	0,14	0,7	—	—
Triosephosphate	0,53	4,2	20,4	—	—	0,14	0,7
Drei „S + P"-Verbindungen	0,52	4,2	19,8	—	—	0,13	0,6
Nucleotidfraktion „NF_{IV}" .	0,51	4,1	19,2	—	—	0,13	0,6
Cytidin-5′-monophosphat .	0,3	2,2	11,6	0,07	0,4	—	—

Die Übersichtstabelle zeigt für alle erfaßten P-Verbindungen Mittelwerte aus 20 getrennt durchgeführten Untersuchungen. Geordnet sind die Substanzen nach ihrem in der 1. Spalte angegebenen Prozentgehalt Phosphor, bezogen auf den Durchschnittswert für „Gesamt-P_{A+B+C}". In den nächsten Tabellenspalten sind jeweils die Werte in γ P/g und für alle identifizierten P-Ester in μmol/g Feucht- und Trockengewicht wiedergegeben. Für alle noch unbekannten Verbindungen erfolgt schließlich in den beiden letzten Spalten eine Angabe in μmol P/g Feucht- und Trockengewicht.

Orthophosphat mit knapp 30% des Gesamt-P_{A+B+C} ist die absolut größte Fraktion. Damit ergibt sich für organisch gebundenen und den im Orthophosphat gebundenen Phosphor ein Verhältnis von 7:3.

Mit einer nicht-chromatographischen Arbeitsweise bestimmte Werte für säurelösliche P-Verbindungen in verschiedenen Organen und Geweben wurden 1948 von LE PAGE mitgeteilt. Vergleicht man diese Zusammenstellung der Verteilung von P-Estern im Nierengewebe mit unseren Angaben, so ergibt sich überraschenderweise, daß der von uns als Verbindung X an 2. Stelle in der Tabelle geführte P-Ester mit 2,65 µmol P/g Feuchtgewicht übereinstimmt mit der von LE PAGE erfaßten µmol-Menge Glucose-6-phosphat. Wir konnten jedoch mit einiger Sicherheit ausschließen, daß die Verbindung X als Glucose-6-phosphat anzusehen ist, da das papierchromatographische Verhalten beider Verbindungen große Unterschiede aufweist. Glucose-6-phosphat finden auch wir im Nierengewebe, jedoch nur 0,29 µmol/g Feuchtgewicht. Die Frage, ob es sich bei unserer Verbindung X um die von LE PAGE als Glucose-6-phosphat angesprochene Verbindung handelt, muß solange noch unbeantwortet bleiben, bis die Identifizierung der Verbindung X gelungen ist.

AMP mit 5,7% des Gesamt-P_{A+B+C} und 1,44 µmol/g Feuchtgewicht folgt an 3. Stelle in unserer Tabelle. Schon 1930 wurde von EMBDEN u. DEUTICKE die im Nierengewebe vorkommende Adenylsäure auf Grund ihrer Desaminierbarkeit durch Muskeldesaminase als „Muskeladenylsäure" = 5′-AMP identifiziert. Diesen Befund konnten wir durch Anwendung von Lösungsmitteln, die eine Trennung des 3′ (bzw. 2′)-AMP von 5′-AMP gestatten, auch papierchromatographisch bestätigen.

Nur in seltenen Fällen wurden geringe Mengen einer Verbindung gefunden, die sehr wahrscheinlich als 3′ (bzw. 2′)-AMP angesprochen werden kann.

DPN (= Co-Zymase nach v. EULER) mit 5% des Gesamt-P_{A+B+C} bzw. 0,61 µmol/g Frischgewicht bildet noch eine der größten P-Fraktionen. Hierbei ist aber zu berücksichtigen, daß durch Extraktion des Gewebes mit eisgekühlter TCS die reduzierte Form der Co-Zymase, das DPN-H_2, zerstört wird (HOLZER u. Mitarb.), und deshalb unser Wert für DPN nicht als Maß für die stationäre Konzentration des gesamten DPN in der Niere gelten kann. Der tatsächliche Wert für DPN + DPN-H_2 wird noch wesentlich höher liegen.

Es überrascht nicht, daß ein stoffwechselchemisch so tätiges Organ wie die Niere diesen recht großen Gehalt an DPN aufweist, da für die meisten fermentativen Dehydrierungsvorgänge die Mitwirkung von DPN oder aber TPN bewiesen wurde. H.v. EULER u. RUNEHJELM machten schon 1927 darauf aufmerksam, daß die in Nierengewebe mit einer fermentchemischen Bestimmungsmethode erfaßbare Co-Zymasemenge auffallend groß ist. Weiter konnten dann SYM, NILSSON u.v. EULER 1931 zeigen, daß die Nierenrinde etwa doppelt soviel Co-Zymase enthält wie das Nierenmark.

Auf die bisher identifizierten energiereichen P-Ester Kr-P, ADP und ATP entfallen zusammen etwa 10% des Gesamt-P_{A+B+C}. Die µmol-Werte/g dieser 3 Verbindungen verhalten sich nach unseren Befunden im Durchschnitt wie 1,02 (Kr-P) : 0,49 (ADP) : 0,25 (ATP).

Im Gegensatz zu dem recht konstanten Kr-P-Gehalt des Nierengewebes sahen wir, daß der ATP- und ADP-Gehalt stärkere Schwankungen aufweist. So ergaben einige Versuche annähernd gleiche µmol-Werte/g für ADP und ATP; im ganzen gesehen fand sich aber stets mehr ADP als ATP. Diese Befunde stehen in guter Übereinstimmung mit Angaben von Oliver über die Verteilung von ATP und ADP in Rattennieren.

Der mit älteren Methoden bestimmte ATP- und ADP-Gehalt verschiedener Gewebe scheint in den meisten Fällen zu hoch zu liegen, da wegen der Vielzahl von labilen P-Estern in solchen Geweben eine wirklich isolierte Erfassung dieser Verbindungen kaum gelingen konnte. So mag auch zu erklären sein, daß in parenchymatösen Organen früher mehr ATP als ADP gefunden wurde, dagegen in neueren, chromatographisch durchgeführten Untersuchungen, diese beiden Verbindungen als etwa gleich große Fraktionen erkannt werden bzw. ein Überwiegen von ADP über ATP festzustellen ist. Entsprechende Befunde wurden unlängst auch von Rabinowitz u. Mitarb. für Lebergewebe mitgeteilt.

Einige weitere im Nierengewebe vorkommende Phosphorsäureester bzw. Nucleotide konnten als Fructose-6-phosphat, Triosephosphate, Phosphoglycerinsäure, Inosin-5′-monophosphat und Cytidin-5′-monophosphat identifiziert werden. Ihre µmol-Werte/g sowie der auf sie entfallende prozentuale P-Gehalt sind der Tab. 2 zu entnehmen.

Zur Charakterisierung der noch nicht identifizierten Verbindungen kann folgendes angeführt werden:

Unbekannte Nucleotidfraktionen („*NF*“): Bei diesen Verbindungen handelt es sich wahrscheinlich um solche Nucleotide, die in jüngerer Zeit in verschiedenen Geweben von mehreren Autoren (Paladini u. Leloir; Hurlbert: Cabib, Leloir u. Cardini: Bergkvist u. Deutsch; Hurlbert u. Potter; Smith u. Mills; Schmitz, Hurlbert u. Potter; Schmitz) aufgefunden und als Di- und Triphosphate von Cytidin, Guanosin und Uridin sowie als Uridin-5′-diphosphatderivate erkannt wurden. Testsubstanzen dieser neuentdeckten Verbindungen standen uns nicht zur Verfügung.

Die in der Fraktion A erfaßte Verbindung NF_I zeigt übereinstimmende R_f-Werte mit Testsubstanzen von TPN. Eine endgültige Aussage über die Identität von NF_I mit TPN ist aber noch nicht möglich.

Verbindung X und X_1. Da diese beiden Substanzen keine UV-absorbierenden Eigenschaften aufweisen, kann es sich nicht um Nucleotide handeln. Trotz maximaler Anreicherung dieser Verbindungen auf den Chromatogrammen verliefen alle Zuckerfarbreaktionen negativ, so daß mit großer Wahrscheinlichkeit eine Bindung des Phosphates an einfache Pentosen und Hexosen ausgeschlossen werden kann. Unter einer großen Zahl von Testsubstanzen wurden bisher noch keine P-Verbindungen gefunden, die in den verschiedenen Lösungsmittelsystemen mit Verbindung X und X_1 übereinstimmende R_f-Werte ergeben. Durch Anwendung des Ammoniak-Resistenz-Testes wurde erkannt, daß beide Substanzen schwerhydrolysierbare Phosphatbindungen besitzen. Schließlich kann als weitere Eigenschaft dieser Verbindungen angeführt werden,

daß sie mit Barium leichtlösliche Salze bilden, entsprechend ihrem Vorkommen in der Fraktion B.

Es sei noch darauf hingewiesen, daß die in beträchtlicher Menge in Erythrocyten vorkommende 2,3-Diphosphoglycerinsäure nach Anwendung verschiedener saurer Lösungsmittel gleiches papierchromatographisches Verhalten wie die Verbindung X zeigt; lediglich in ammoniakalischen Lösungsmitteln lassen sich Unterschiede in den R_f-Werten dieser beiden Substanzen feststellen. Das gesamte Verhalten der Verbindung X legt die Vermutung nahe, daß es sich bei ihr um einen der 2,3-Diphosphoglycerinsäure verwandten P-Ester handeln könnte.

„S + P"-Verbindungen. Hier handelt es sich um 3 nicht UV-absorbierende Substanzen mit verschiedenen R_f-Werten. Der Schwefelanteil dieser Verbindungen wird erst nach reduktiver Aufspaltung mit KCN durch die Nitroprussidreaktion erfaßt; dies spricht gegen eine SH-Bindung und für S-S- oder andere leichter spaltbare S-Bindungen. Alle 3 Verbindungen enthalten Phosphor in Mengen von weniger als 0,1 μmol/g Frischgewicht. Die Vermutung liegt nahe, daß diese „S + P"-Verbindungen Bruchstücke des Coenzyms A sind; dann müßte allerdings das Coenzym A nicht mehr eine freie SH-Gruppe am Äthanolamin-Rest tragen, sondern eine mercaptanartige S-Bindung, vielleicht nach Art der Acetylmercaptan-Bindung.

Immerhin wäre es auch möglich, daß in der Niere phosphorylierte schwefelhaltige Aminosäuren vorkommen. Co-Carboxylase konnte ausgeschlossen werden, da sie von den „S + P"-Verbindungen durch ihre UV-absorbierenden Eigenschaften und auf Grund ihres papierchromatographischen Verhaltens einfach zu unterscheiden ist.

Über die Abweichungen vom Durchschnittswert der Tab. 2 in den einzelnen Versuchen kann für die verschiedenen P-Ester gesagt werden:

Im Verlauf unserer von März bis August 1954 durchgeführten Untersuchungen konnten wir beobachten, daß der Gehalt der Nieren besonders an ATP und ADP in Abhängigkeit von der Jahreszeit bestimmte Änderungen erfährt. Die höchsten ATP-Werte und ein Verhältnis von ATP:ADP in μmol/g von ungefähr 0,48:0,54 wurden im März und April gefunden; in den Sommermonaten fielen dann die ATP-Werte stärker ab als die von ADP, so daß sich bei den tiefsten Werten ein μmol/g-Verhältnis von 0,19:0,39 einstellte. Im September durchgeführte Kontrollversuche ergaben ein Wiederansteigen der ATP-Werte. Diese jahreszeitlich bedingten Schwankungen im ATP- und ADP-Gehalt konnten auch von Fleckenstein u. Janke über einen Zeitraum von mehr als 2 Jahren in Untersuchungen am Frosch-Rectus beobachtet werden. Überdies ist aus Diureseversuchen an Ratten bekannt (Vollmer; Haas), daß auch hierbei mit größeren Unterschieden in dem Verhalten von Sommer- und Winterratten zu rechnen ist.

Eine stärkere Abnahme des ATP- bei nur geringfügiger Verminderung des ADP-Gehaltes der Nieren konnte festgestellt werden, wenn die Ratten 4 Wochen lang mit einem vitaminarmen Körnerfutter ernährt worden waren. Diese Beobachtungen zeigen deutlich, daß die Verteilung einiger P-Verbindungen im Nierengewebe durch die Nahrung beeinflußbar ist.

Während sich in sämtlichen Untersuchungen für säurelöslichen Gesamtphosphor, die meisten Nucleotide, sowie für Orthophosphat, Kreatinphosphat und besonders Verbindung X von Tier zu Tier recht konstante Werte ergaben, wurden

zum Teil größere Schwankungen in dem Gehalt an Triose- und Hexose-P-Verbindungen beobachtet. Unsicher ist hierbei, ob diese Befunde zurückzuführen sind auf eine nichtkonstante Ausgangsstoffwechsellage im Nierengewebe, oder ob sie hinreichend erklärt werden können durch individuelle Unterschiede in der Verteilung dieser Verbindungen.

Einblicke in die engeren Beziehungen zwischen dem Stoffwechsel der P-Verbindungen und der Funktion der Nieren sind wohl am besten zu erhalten, wenn durch Anwendung nierenwirksamer Substanzen und bestimmter Gifte der normale Stoffwechsel spezifisch beeinflußt oder blockiert wird.

Zusammenfassung.

1. Da eine direkte papierchromatographische Auftrennung aller im trichloressigsauren Extrakt von Rattennieren vorkommenden Phosphorverbindungen wegen ihrer Vielzahl und der Ähnlichkeit in den R_f-Werten mit den verschiedensten Lösungsmittelsystemen nicht erreicht werden kann, ergibt sich die Notwendigkeit einer chemischen Vorfraktionierung. Durch eine modifizierte Barium-Alkohol-Fällung wird daher der trichloressigsaure Gesamtnierenextrakt in 3 Fraktionen unterteilt.

2. Zwei dieser Fraktionen, in denen die meisten Phosphorverbindungen enthalten sind, werden getrennt papierchromatographisch aufgearbeitet. Dabei gelingt es, mit neuentwickelten Lösungsmitteln unter Ausnutzung verschiedener Verfahren der Papierchromatographie 23 phosphorhaltige Verbindungen isoliert zu erfassen.

3. Zur Erkennung und Identifizierung dieser P-Verbindungen dienen: Ammoniak-Resistenz-Test, Photoprintverfahren, charakteristische Farbreaktionen, R_f-Wert-Bestimmung in bekannten und neuen Lösungsmitteln, Vergleichschromatographie mit Testsubstanzen, „Mischchromatographie“ und verschiedene andere Verfahren.

Die quantitative Auswertung erfolgt über die elektrocolorimetrische Bestimmung des Phosphorgehaltes jeder erfaßten Verbindung.

4. Die an 20 Tieren getrennt durchgeführten Untersuchungen erlauben die Aufstellung einer Mittelwerttabelle über die Normalverteilung säurelöslicher Phosphorverbindungen im Nierengewebe. Ordnet man die Verbindungen entsprechend ihrem prozentualen P-Gehalt, bezogen auf den säurelöslichen Gesamtphosphor, so ergibt sich, daß Orthophosphat mit 30% die absolut größte Fraktion ist. Es folgt an zweiter Stelle eine noch nicht identifizierte Verbindung mit 10%. AMP mit 5,7% und DPN mit 5% finden sich regelmäßig in größeren Mengen als die 3 energiereichen Verbindungen Kreatinphosphat mit 4,5%, ADP mit 3,8% und ATP mit 2,6%. IMP, CMP und 6 noch nicht identifizierte Nucleotide sowie 5 verschiedene phosphorylierte Hexosen und Triosen finden sich nur in geringeren Mengen. Es werden außerdem 3 Verbindungen erfaßt, die Schwefel und Phosphor enthalten.

Verwendete Testsubstanzen.

Kreatinphosphat, Acetylphosphat, 2-Phosphoglycerinsäure, 3-Phosphoglycerinsäure, Glucose-1-phosphat, Glucose-6-phosphat, Hexose-1,6-diphosphat, Phosphoenol-brenztraubensäure, α-Glycero-phosphat, Adenosin-5′-monophosphat, Inosin-5′-triphosphat, Triphosphopyridinnucleotid, Diphosphopyridinnucleotid, Thiaminmonophosphat, Co-Carboxylase und Flavin-mononucleotide wurden uns von Herrn Prof. H. A. Krebs und Herrn Dr. R. E. Davies (British Medical Research Council, Unit for Research in Cell Metabolism, Dept. of Biochemistry, University of Oxford) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Adenosin-5′-triphosphat (tert. Na-Salz), Adenosin-3′-monophosphat, Adenosin-5′-monophosphat, Guanosin-monophosphat und Inosin-monophosphat von der Zellstoffabrik Waldhof, Mannheim-Waldhof.

3-Phosphoglycerinsäure (Ba-Salz) und verschiedene Präparate von Diphosphopyridinnucleotid (DPN 75, DPN 95 und hydriertes DPN) von der Firma C. F. Boehringer & Soehne, Mannheim.

Cytidin-monophosphat von der Chem. Fabrik Deutsche Hoffmann-La Roche, Grenzach-Baden.

Guanosin-monophosphat (Na-Salz) und Hexose-1,6-diphosphat von dem Chem. pharm. Werk Dr. Georg Henning, Berlin-Tempelhof.

Uridin-monophosphat wurde von der Firma Light & Co. Ltd., England, bezogen.

Fructose-6-phosphat wurde durch saure Hydrolyse von Hexose-1,6-diphosphat als chromatographisch einheitliche Substanz selbst hergestellt.

Herrn Prof. Eichholtz danken wir herzlich für die Anregung zu der vorliegenden Arbeit und die vielseitige freundliche Förderung.

Dem Deutschen Komitee des „Williams-Waterman Fund of the Research Corporation (New York)“ gilt unser ganz besonderer Dank für die materielle Unterstützung.

Herrn Prof. H. A. Krebs und Herrn Dr. R. E. Davies sowie den Firmen: Zellstoffabrik Waldhof, C. F. Boehringer & Soehne, Deutsche Hoffmann-La Roche und Dr. Georg Henning sprechen wir unseren Dank aus für die Überlassung von Testsubstanzen.

Literatur.

Bandurski, R. S., and B. Axelrod: The chromatographic identification of some biologically important phosphate esters. J. of Biol. Chem. **193**, 405 (1951). — Berenblum, I., and E. Chain: An improved method for the colorimetric determination of phosphate. Biochemic. J. **32**, 295 (1938). — Berckvist, R., and A. Deutsch: Guanosine triphosphate and uridine triphosphate from muscle. Acta chem. scand. (Copenh.) **7**, 1307 (1953). — Block, R. J., R. le Strange and G. Zweig: Paper Chromatography. New York: Academ. Press. Inc. 1952. — Burrows, S., F. S. M. Grylls and J. S. Harrison: Paper chromatography of phosphoric esters. Nature (Lond.) **170**, 800 (1952). — Cabib, E., L. F. Leloir and C. E. Cardini: Uridine diphosphate acetylglucosamine. J. of Biol. Chem. **203**, 1055 (1953). — Carter, C. E.: Paper chromatography of purine- and pyrimidin-derivatives of yeast ribonucleic acid. J. Amer. Chem. Soc. **72**, 1466 (1950). — Chargaff, E., C. Levine and Ch. Green: Techniques for the demonstration by chromatography of nitrogenous lipide constituents, sulfur containing amino acids, and reducing sugars. J. of Biol. Chem. **175**, 67 (1948). — Chernick, S. S., J. L. Chaikoff and S. Abraham: Localization of initial block in glucose metabolism in diabetic liver sclices. J. of Biol. Chem. **193**, 793 (1951). — Cori, G. T., and C. F. Cori: A method for the determination of hexosemonophosphate in muscle. J. of

Biol. Chem. **94**, 561 (1932). — Cramer, F.: Papierchromatographie. Weinheim/Bergstraße: Verlag Chemie 1953. — Eggleston, L. V., and R. Hems: Separation of adenosine phosphates by paper chromatography and the equilibrium constant of the myokinase system. Biochemic. J. **52**, 156 (1952). — Embden, G., u. H. J. Deuticke: Über die Isolierung von Muskeladenylsäure aus der Niere. Z. physiol. Chem. **190**, 62 (1930). — v. Euler, H., u. D. Runehjelm: Co-Zymase-Gehalt verschiedener tierischer Gewebe. Z. physiol. Chem. **165**, 306 (1927). — Fleckenstein, A., u. E. Gerlach: Papierchromatographische Trennung von ATP, ADP und anderen Phosphorverbindungen bei Säugetier- und Tauben-Erythrocyten verschiedenen K^+-Gehalts. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 531 (1953). — Fleckenstein, A., E. Gerlach u. J. Janke: Ein neuer Schnelltest zur Identifizierung leicht und schwer hydrolysierbarer Phosphorsäure-Ester im Papierchromatogramm. Naturwissenschaften **40**, 462 (1953). — Fleckenstein, A., u. J. Janke: Papierchromatographische Trennung von ATP, ADP und anderen Phosphor-Verbindungen im kontrahierten und erschlafften Froschmuskel. Pflügers Arch. **258**, 177 (1953). — Fleckenstein, A., J. Janke, G. Lechner u. G. Bauer: Zerfällt Adenosintriphosphat bei der Muskelkontraktion? Pflügers Arch. **259**, 246 (1954). — Forsyth, W. G. C.: Colour reagents for the paper chromatography of sugars. Nature (Lond.) **161**, 239 (1948). — Gerlach, E., E. Weber u. H. J. Döring: Einige neue Lösungsmittel für die Papierchromatographie von Phosphorsäure-Estern. Biochem. Z.: im Druck. — Haas, H.: Private Mitteilung. Pharmakol. Laborat. der Chem. Fabriken Knoll AG, Ludwigshafen/Rh. — Hanes, C. S., and F. A. Isherwood: Separation of the phosphoric esters on the filter paper chromatogram. Nature (Lond.) **164**, 1107 (1949). — Hockenhull, D. J. D.: A new spraying agent for paper chromatography of carbohydrates and polyols. Nature (Lond.) **171**, 982 (1953). — Holzer, H., S. Goldschmidt, W. Lamprecht u. E. Helmreich: Bestimmung stationärer Zwischenstoffkonzentrationen. I. Bestimmung stationärer DPN/DPNH-Konzentrationen in lebenden Zellen und Geweben. Z. physiol. Chem. **297**, 1 (1954). — Horrocks, R. H.: Paper partition chromatography of reducing sugars with benzidine as a spraying reagent. Nature (Lond.) **164**, 444 (1949). — Hurlbert, R. B.: Uridine-5-phosphate compounds as intermediates in the incorporation of orotic acid into RNA. Federat. Proc. **12**, 222 (1953). — Hurlbert, R. B. and V. R. Potter: Nucleotide metabolism. I. The conversion of orotic acid-6-C^{14} to uridine nucleotides. J. of Biol. Chem. **209**, 1 (1954). — Isherwood, F. A., and M. A. Jermyn: Relationship between the structure of the simple sugars and their behaviour on the paper chromatogram. Biochemic. J. **48**, 515 (1951). — Lehnartz, E.: Einführung in die chemische Physiologie. 10. Auflage. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1952. — le Page, G. A.: in „Manometric Techniques and Tissue Metabolism". Ed. by W. W. Umbreit, R. H. Burris and J. F. Stauffer. Minneapolis: Burgess Publishing Co., II. Edit. Chpter XV. — Phosphorylated intermediates in tumor glycolysis. Cancer Res. **8**, 193 (1948). — Markham, R., and J. D. Smith: Chromatographic studies of nucleic acids. 1. A technique for the identification and estimation of purine and pyrimidine bases, nucleosides and related substances. Biochemic. J. **45**, 294 (1949). — Mudge, G. H., and J. V. Taggart: Effect of 2,4-dinitrophenol on renal transport mechanism in the dog. Amer. J. Physol. **161**, 173 (1950). — Oliver, I. T.: Private Mitteilung durch Dr. R. E. Davies (British Medical Research Council, Unit for Research in Cell Metabolism, Dept. of Biochemistry, University of Oxford). — Paladini, A. C., and L. F. Leloir: Studies on uridine-diphosphate-glucose. Biochemic. J. **51**, 426 (1952). — Partridge, S. M.: Aniline hydrogen phthalate as a spraying reagent for chromatography of sugars. Nature (Lond.) **164**, 443 (1949). — Rabinowitz, J. C., G. Jacobs, L. J. Teply, V. H. Cheldelin, E. Dimant, H. R. Mahler and

F. M. Huennekens: The incorporation of ^{32}P-labelled orthophosphate into nucleotides. Biochim. et Biophys. Acta **13**, 413 (1954). — Sacks, J.: A fractionation procedure for the acid-soluble phosphorus compounds of liver. J. of Biol. Chem. **181**, 655 (1949). — Schmitz, H.: Isolierung von freien Nucleotiden aus verschiedenen Geweben. III. Mitt. Vorkommen von Nucleosid-5′-phosphaten im säurelöslichen Extrakt aus Hefe. Biochem. Z. **325**, 555 (1954). — Schmitz, H., R. B. Hurlbert and V. R. Potter: Nucleotide metabolism. III. Mono-, di- and triphosphates of cytidine, guanosine and uridine. J. of Biol. Chem. **209**, 41 (1954). — Siekevitz, Ph., and V. R. Potter: The effect of 2,4-dinitrophenol and of fluoride on oxydations in normal and tumor tissues. Cancer Res. **13**, 513 (1953). Smith, E. E. B., and G. T. Mills: Uridine nucleotide compounds of liver. Biochim. et Biophys. Acta **13**, 386 (1954). — Sym, E., R. Nilsson u. H. v. Euler: Co-Zymasegehalt verschiedener tierischer Gewebe. Z. Physiol. Chem. **190**, 228 (1930). — Taggart, J. V., and R. P. Forster: Renal tubular transport: effect of 2,4-dinitrophenol and related compounds on phenol red transport in the isolated tubules of the flounder. Amer. J. Physiol. **161**, 167 (1950). — Toennies, G., and J. I. Kolb: Techniques and reagents for paper chromatography. Analyt. Chemistry **23**, 823 (1951). — Vollmer, H.: Über die Wirkung einmaliger Coffeininjektionen auf Mineralausscheidung und Harnmenge. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **194**, 551 (1940). — Williams, R. J.: Referiert in „Paper Chromatography", by R. J. Block, R. le Strange and G. Zweig. New York: Academic Press Inc. 1952. S. 142. — Witter, R. F., E. H. Newcomb and E. Stotz: Studies of the mechanism of action of dinitrophenol. J. of Biol. Chem. **202**, 291 (1953). — Zetterström, R., and M. Ljunggreen: The renewal of phosphate in acid-soluble nucleotides in the liver and the brain. Acta chem. scand. (Copenh.) **5**, 291 (1951).

Dr. E. Gerlach, Heidelberg, Pharmakol. Inst. der Universität.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 224, S. 523—527 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. F. Eichholtz).

Zur Wirkung von ACTH, DOCA, Testosteronpropionat und Thyroxin auf die Pentothal-Schlafzeit hypophysektomierter Ratten*.

(Kurze Mitteilung.)

Von
H. Waltz, M. Bartels und H. Matthies.

(Eingegangen am 22. November 1954.)

Die Barbitursäureempfindlichkeit wird durch Adrenalektomie (Eichholtz u. Mitarb.) und Kastration männlicher Tiere erhöht (Cameron u. Mitarb.; Moir; Grewe; Crevier u. Mitarb.). Substitution mit Nebennierenrindenhormon bzw. Testosteron führt dementsprechend zur Normalisierung der verlängerten Narkosezeiten. Einflüsse der Schilddrüse auf die Narkoseempfindlichkeit wurden im Zusammenhang mit Avertin diskutiert (Lendle; Sebening; Pribram u. a.).

Die vorliegenden Untersuchungen gingen von der Beobachtung aus, daß auch Hypophysektomie zu verlängerten Narkosezeiten führt und befassen sich mit der Frage, inwiefern diese Verlängerung durch die verminderte Funktion von Nebennierenrinde, Gonaden und Schilddrüse bedingt ist. Die Verwendung hypophysenloser Ratten bot Gelegenheit, die Wirkung von ACTH, Nebennierenhormon, Testosteron bzw. Thyroxin ohne gleichzeitige Veränderungen der HVL-Funktion zu studieren.

Männliche weiße Ratten im Gewicht von 80—120 g wurden in Avertinnarkose (300 mg/kg subcutan) parapharyngeal hypophysektomiert. Die Tiere erhielten bei der Operation und am 1. Tag danach 5000, am 2., 3. und 4. Tag nach der Operation je 2000 E Depotpenicillin. Die Vollständigkeit der Hypophysektomie wurde, außer durch autoptische Kontrolle bei Operation und Sektion, an Hand des Körpergewichts sowie der Nebennieren- und Hodengewichte beurteilt. Ergebnisse an Tieren, die bis zum 3. Tag nach der Operation eingingen, wurden nicht verwertet. Das Futter bestand aus Mischkost annähernd konstanter Zusammensetzung.

Die Narkoseempfindlichkeit wurde, wie schon in den Versuchen von Eichholtz u. Mitarb., mit Pentothal-Na geprüft. Die Tiere erhielten pro 100 g Körpergewicht 0,15 cm^3 einer 1%igen Lösung, entsprechend 15 mg Pentothal/kg, in 45 sec i.v. Als „Schlafzeit" wurde die Zeit von Beendigung der Injektion bis zur Wiederkehr des Aufrichtungsreflexes gerechnet. Sie wurde am 7. und 3. Tag vor der Operation kontrolliert und vom 3. Tag nach der Operation an, wie auch in den Kontrollserien, alle vier Tage bestimmt. Die relativ große Streuung der Werte ist darauf zurückzuführen, daß die verwendete Pentothaldosis bei der jeweils in Tab. 1 angegebenen

* Herrn Prof. Dr. F. Eichholtz zum 65. Geburtstag gewidmet.

Tabelle 1.

	Tage	1	5	9	13
9 nichtoperierte Kontrolltiere	Mittlere Schlafzeit in sec	17 ± 8[1]	22 ± 15	2 ± 2	8 ± 8
	Anzahl der Bestimmungen[2]	9	9	9	9
	Anzahl der Tiere ohne Seitenlage	5	7	8	8
15 hypophysektomierte Ratten ohne Behandlung	Mittlere Schlafzeit in sec	20 ± 12	12 ± 5	118 ± 48	136 ± 43
	Anzahl der Bestimmungen	11	12	14	14
	Anzahl der Tiere ohne Seitenlage	5	6	4	3
13 hypophysektomierte Ratten, täglich 0,4 mg ACTH	Mittlere Schlafzeit in sec	15 ± 7	14 ± 6	88 ± 31	59 ± 17
	Anzahl der Bestimmungen	13	13	11	12
	Anzahl der Tiere ohne Seitenlage	6	7	5	8
12 hypophysektomierte Ratten, täglich 0,5 mg DOCA	Mittlere Schlafzeit in sec	8 ± 7	3 ± 2	14 ± 11	60 ± 33
	Anzahl der Bestimmungen	12	12	12	11
	Anzahl der Tiere ohne Seitenlage	9	10	10	6
8 hypophysektomierte Ratten, täglich 0,2 mg Testosteronpropionat	Mittlere Schlafzeit in sec	31 ± 17	26 ± 11	89 ± 34	41 ± 18
	Anzahl der Bestimmungen	8	8	8	8
	Anzahl der Tiere ohne Seitenlage	4	4	3	3

Operation, Beginn der Substitution

[1] Mittlerer Fehler des Mittelwerts.

[2] Die i.v. Injektion von Pentothal gelang nicht in allen Fällen. Nähere Erläuterung im Text.

Anzahl von Tieren unterschwellig war. Die sonst übliche i. p. Injektion größerer Pentothalmengen erwies sich jedoch bei hypophysektomierten Tieren unter Umständen als lebensgefährlich.

Die einzelnen Versuchsserien sind aus Tab. 1 ersichtlich. Nicht aufgeführt sind darin 5 scheinoperierte Kontrolltiere und 10 hypophysektomierte, mit 10 γ Thyroxin täglich behandelte Ratten. Die Substitution erfolgte durch i. p. Injektion. Die Tiere wurden, sofern sie nicht früher eingingen, zu dem aus Tab. 2 ersichtlichen Termin geopfert. Das mittlere Nebennieren- und Hodengewicht betrug zu diesem Zeitpunkt bei den 9 nicht operierten Kontrolltieren 33 ± 1,8 bzw. 1172 ± 150 mg, das Körpergewicht 125 ± 3,6 g. Die entsprechenden Zahlen lauteten bei den 15 hypophysektomierten Kontrolltieren 5,5 ± 0,47 und 210 ± 13 mg bzw. 86 ± 2 g und bei den mit ACTH behandelten hypophysektomierten Tieren 13,6 ± 0,82 und

Tabelle 1.

17	21	25	29	33	45	49	53
10 ± 7	50 ± 20	3 ± 2,4	12 ± 6	2 ± 2			
8	9	9	9	8			
6	4	7	6	7			
174 ± 43	232 ± 52	170 ± 52	330 ± 141	225 ± 68	400 ± 122	451 ± 116	
14	15	14	9	9	6	5	
3	0	1	3	3	0	0	
46 ± 35	11 ± 6	19 ± 3	5 ± 5	6 ± 6	56 ± 24	105 ± 35	199 ± 111
11	13	13	13	11	10	12	10
8	10	7	12	10	5	4	4
79 ± 55	70 ± 22	0	16 ± 8	6 ± 6	158 ± 88		
11	10	10	10	9	6		
8	7	10	7	8	3		
67 ± 44	18 ± 13	27 ± 14	22 ± 22	0 ± 0			
7	7	6	4	4			
5	4	3	3	4			

Ende der Substitution

407 ± 75 mg bzw. 97 ± 3,4 g. Die Werte für NN-, Hoden- und Körpergewicht aus den Serien mit DOCA, Testosteron und Thyroxin entsprachen bei Berücksichtigung der größeren Mortalität denen der hypophysektomierten Kontrolltiere.

Aus Tab. 1 geht hervor, daß die Pentothal-Schlafzeit nach Hypophysektomie innerhalb von 15 Tagen auf das 15—20fache ansteigt. Diese Zunahme ist geringer und erfolgt langsamer als in den Versuchen von Eichholtz u. Mitarb. nach Adrenalektomie, übertrifft aber bei weitem jene nach Kastration männlicher Tiere. Eine herausragende Bedeutung der Nebennierenrinde ergibt sich auch aus der Relation zwischen Nebennierengewicht und Schlafzeit an total und (zufälligerweise) nur teilweise hypophysektomierten Tieren, bei denen die Verlängerung der Narkosezeit dem Grad der Nebennierenatrophie weitgehend parallel verlief. In Übereinstimmung damit gelingt es durch ACTH-Mengen, welche

nach Simpson u. Mitarb. die Nebennierenatrophie verhindern[1], die Pentothal-Schlafzeit hypophysektomierter Tiere zu normalisieren[2]. Auch die von Eichholtz u. Mitarb. bei adrenalektomierten Ratten ermittelte Aufbrauchdosis von 0,5 mg DOCA genügte zur Reduktion der Narkosezeiten (Tab. 1). Nach Beendigung der Substitution stieg die Schlafzeit in beiden Serien an, doch sind die Ergebnisse mit DOCA hier wegen der hohen Mortalität unzuverlässig. Im Gegensatz dazu war zur Erzielung ähnlicher Effekte auf die Narkoseempfindlichkeit die tägliche i. p. Injektion von 200 γ Testosteronpropionat erforderlich. Im Loewe-Voss-Test sind aber bei i. m. Injektion schon 20 γ wirksam (Voss). Damit scheint zwar eine hypophysenunabhängige Wirkung von Testosteron auf die Pentothal-Schlafzeit gesichert; der Funktionsausfall der Gonaden scheint an der Schlafzeiterhöhung nach Hypophysektomie jedoch nur geringgradig beteiligt zu sein.

Tabelle 2.

Tage nach Operation	Anzahl der lebenden Tiere in den Serien mit				
	ACTH	DOCA	Testosteron	Thyroxin	ohne Behandlung
3	13	12	8	10	15
7	13	12	8	5	15
11	13	12	8	2	15
15	13	12	7	1	15
19	13	10	7	0	15
23	13	10	6		13
27	13	9	4		11
31[1]	13	9	2		10
35	12	8	2		7
39	12	7	1		7
43	12	5	1		6
47	12	3	1		

[1] Ende der Substitution.

Die Ergebnisse der Thyroxinserie konnten wegen der hohen Mortalität nicht verwertet werden (Tab. 2). Ob die größere Sterblichkeit durch Thyroxinmengen, welche den Tagesbedarf der Ratte (Literatur s. bei Grab) nur um das 2—3fache übersteigen, verursacht wurde, ist fraglich. Die verschiedenen Versuchsserien wurden gleichzeitig durchgeführt und irgendwelche Anzeichen einer Laboratoriumsinfektion lagen nicht vor. Nach den Angaben von Mathies u. Mitarb. werden vom 28. Tag nach Hypophysektomie an sogar 50 γ Thyroxin pro Tag vertragen. In unseren Versuchen wurde allerdings schon am Operationstag mit der Thyroxin-Injektion begonnen.

[1] Die Nebennieren unserer hypophysektomierten Tiere wurden erst 20 Tage nach dem Absetzen von ACTH gewogen.

[2] Der vorübergehende Anstieg der Pentothal-Schlafzeit dürfte nach den Ergebnissen an scheinoperierten Tieren Folge des Operationstraumas sein.

Literatur.

Cameron, G. R., G. H. Cooray and S. N. De: The effect of castration on the action of some barbiturates. J. of Path. **60**, 239 (1948). — Crevier, M., A. d'Iorio et E. Robillard: Influence des glandes sexuelles sur la désintoxication du pentobarbital par le foie. Rev. canad. de Biol. **9**, 336 (1950). — Eichholtz, F., R. Hotovy, P. Collischonn und H. Knauer: Beeinflussung der Entgiftungszeiten von Avertin und Pentothal-Natrium an der nebennierenlosen Ratte durch Nebennieren-Rindenhormon (Pentothal-Natriumtest). Arch. exper. Path. und Pharmakol. **207**, 576 (1949). — Grab, W.: Pharmakologie der Schilddrüsentätigkeit. 18. Tagung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft, Mainz 1951. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 16 (1952). — Grewe, H. E.: Experimentelle Untersuchungen der geschlechtsverschiedenen Wirksamkeit von Barbitursäurederivaten zur Narkose. Z. exper. Med. **121**, 497 (1953). — Lendle, L.: Schmerz, Nark. Anästh. **5**, 239 (1928). — Mathies, J. C., E. D. Goodman and L. Palm: Effects of hypophysectomy, growth hormone and thyroxine on phosphatase of tibia, liver, spleen and kidneys of rat. Amer. J. Physiol. **168**, 352 (1952). — Moir, W. M.: The influenece of age and sex on the repeated administration of sodium pentobarbital to albino rats. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **59**, 68 (1937). — Pribram, B. O.: Die Steuerungsmöglichkeit der Avertinnarkose durch Thyroxin. Dtsch med. Wschr. **1929**, 1457. — Sebening, W.: Physiologische Grundlagen der Avertinnarkose. Schmerz, Nark. Anästh. **2**, 403 (1930). — Simpson, M. E., H. M. Evans and C. H. Li: Bioassay of Adrenocorticotropic Hormone. Endocrinology (Springfield, Ill.) **33**, 261 (1943). – Voss, E. H.: Persönliche Mitteilung.

Dr. H. Waltz, Heidelberg, Pharmakol. Inst. d. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 224, S. 528—537 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. F. Eichholtz).

Lungenvolumen und Überlebenszeit des Atmungszentrums bei Erstickung unter Berücksichtigung von Glucose und Glutaminsäure*.

Von
H.-G. Straub, E. Feucht, A. Schäfer und R. Taugner.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 22. November 1954.)

Die asphyktische bzw. anoxische Atmungslähmung der Ratte ist unter verschiedenen experimentellen Bedingungen zur Beurteilung der Überlebenszeit zentralnervöser Funktionen und der dabei ablaufenden physiologisch-chemischen Vorgänge herangezogen worden. Daraus ergaben sich unter anderem Hinweise auf die Abhängigkeit einzelner Stadien der terminalen Atmung (1. Schnapp-Phase, präterminale Apnoe, 2. Schnapp-Phase) von aeroben bzw. anaeroben Stoffwechselvorgängen (Literatur bei Gänshirt u. Mitarb.). Die reflektorische Beeinflußbarkeit der genannten Stadien, z. B. durch den afferenten Lungenvagus, ist bisher nicht systematisch geprüft worden.

Bei den vorliegenden Untersuchungen über die Wirkung von Glucose, Glutaminsäure u. a. schien die Überlebenszeit des Atmungszentrums unter dem Einfluß unterschiedlicher Lungenfüllung zu variieren. Näheres Studium ergab, daß dabei weniger das wechselnde Sauerstoffangebot als die verschiedene Lungenblähung von Bedeutung ist. Diese Beobachtung gab Anlaß, die Wirkung vagaler Afferenzen auf die Überlebenszeit des Atmungszentrums und die einzelnen Stadien der Atmungslähmung näher zu studieren. Derartige Untersuchungen sind vor allem im Hinblick auf die 2. Schnapp-Phase von Interesse, die den Grundtypus der vom Atmungszentrum intendierten Bewegungen darstellen und reflektorischen Einflüssen nicht zugänglich sein soll.

Versuchsanordnung. Zur Verwendung kamen weiße Ratten im Gewicht von 180—220 g. Die Tiere der in Tab. 1 aufgeführten Versuchsserien wurden nach dem Vorgehen von Gänshirt u. Mitarb. mit Urethan (1 g/kg in 10%iger Lösung subcutan) narkotisiert, bei einer Körpertemperatur von 37° gehalten und — mit Ausnahme von Versuchsserie g — im Abstand von 15 min je 5mal einer Erstickung durch Trachealverschluß ausgesetzt. Die einzelnen Atemzüge wurden auf einem Rußkymographion verzeichnet, Dauer von 1. Schnapp-Phase, präterminaler Apnoe,

* Herrn Prof. Dr. F. Eichholtz zum 65. Geburtstag gewidmet.

2. Schnapp-Phase und Gesamtüberlebenszeit auf der Zeitschreibung abgelesen. Die zu prüfenden Stoffe wurden im allgemeinen 5, ATP 1 min vor der 1. Erstickung i.v. injiziert.

Die Vagotomie erfolgte 5—10 min vor dem ersten Versuch, die elektrische Reizung der zentralen Vagusstümpfe mit Rechteckimpulsen über chlorierte, mit Kunststoff isolierte Silberelektroden unter Verwendung des großen Reizgerätes der Fa. Medeor-Hamburg. Zur Lungenblähung wurde Zimmerluft bzw. technischer Stickstoff mit einem Sauerstoffgehalt von 1—3% verwendet. Verschluß der Trachealkanüle erfolgte in Exspirationsstellung oder im Anschluß an die Lungenfüllung.

Zur Abtrennung der aktiven Exspiration wurden außerdem vergleichende Versuche mit dem isolierten Bauchmuskel- bzw. Zwerchfellstreifen durchgeführt (vgl. Eichholtz u. Taugner; Taugner, Essig u. Dertnig). Diese Tiere waren mit Avertin (30 mg/kg subcutan) narkotisiert. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des t-Testes von Fisher. In den Versuchsserien a und c wurden Mittelwert und mittlerer Fehler aus je 2 Versuchsreihen von 6, bei e (1.) von 6 und 11 Tieren nach der in der Ausgleichsrechnung üblichen Methode zur Bestimmung dieser Werte aus Mitteln verschiedener Genauigkeit gebildet.

Versuchsergebnisse.

Entsprechend Tab. 1a, b und c führt *Lungenblähung mit 5 cm³ Luft oder Stickstoff* zur deutlichen Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit des Atmungszentrums. Bei Verwendung von Luft nehmen sämtliche Stadien, vor allem die 2. Schnapp-Phase, bei Stickstoff die präterminale Apnoe am stärksten zu. Die 1. Schnapp-Phase kann bei Stickstoffblähung (im Gegensatz zur Luftblähung) sogar verkürzt sein[1]. Charakteristisch für die Erstickung bei Lungenblähung war das Auftreten einer „Vagus-Apnoe" zu Beginn der 1. Schnapp-Phase[2], welche bei Verwendung von Luft im 1. Versuch $26 \pm 2{,}1$, bei Stickstoff 30 ± 7 sec dauerte.

Nach doppelseitiger *Vagotomie* führte Lungenblähung mit 5 cm³ Luft dagegen nicht zur Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit (Tab. 1f). 1. Schnapp-Phase und präterminale Apnoe waren hier im Vergleich zu den nicht vagotomierten Kontrolltieren (Tab. 1a) von der 2. Erstickung an sogar etwas verkürzt, die 2. Schnapp-Phase dafür deutlich verlängert. Diese Abweichungen sind — entsprechend Versuchsserie e mit vagotomierten Kontrolltieren — nicht auf das größere Sauerstoffangebot, sondern auf die Vagotomie selbst zurückzuführen. Damit schien erwiesen, daß die Verlängerung der Überlebenszeit des Atmungszentrums bei Lungenblähung über den Vagus zustande kommt.

Binet u. Strumza hatten beobachtet, daß künstliche Beatmung während der präterminalen Apnoe das Auftreten der 2. Schnapp-Phase wesentlich verzögert. Es sollte nun geprüft werden, ob dieser Effekt durch die bei künstlicher Ventilation erfolgende diskontinuierliche Lungenblähung bedingt sein kann. 6 Ratten wurden daher von der 30. sec nach Beginn der präterminalen Apnoe an mit Stickstoff beatmet (Atemvolumen: 5 cm³, Atemfrequenz 96/min). Die präterminale Apnoe

[1] 50 mg Glucose (Tab. 1d) bzw. 12 mg Glutaminsäure/100 g verstärkten die Blähungseffekte nicht.

[2] Diese Atempause wurde in die Dauer der 1. Schnapp-Phase mit einbezogen.

Tabelle 1.

Versuchsserien	Anzahl d. Tiere		Gesamtüberlebenszeit in sec					1. Schnapp-Pha		
			1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	3.
a) Kontrolltiere	12	M	124	106	100	98	96	53	43	47
		ε	$\pm$ 0,7	$\pm$ 0,5	$\pm$ 2,1	$\pm$ 2,1	$\pm$ 2	$\pm$ 2	$\pm$ 0,6	$\pm$ 0,7
b) Lungenblähung mit 5 cm³ Luft	6	M	172	132	120	126	119	67	52	48
		ε	$\pm$ 7,7	$\pm$ 9,2	$\pm$ 5,2	$\pm$ 8,7	$\pm$ 7,7	$\pm$ 4,1	$\pm$ 6,9	$\pm$ 5,4
		P[1]	$<$ 0,01	$<$ 0,05	$<$ 0,01	$<$ 0,01	$<$ 0,05	$<$ 0,01	$<$ 0,1	—
c) Lungenblähung mit 5 cm³ N_2	12	M	145	120	109	109	109	47	37	43
		ε	$\pm$ 7,4	$\pm$ 2,8	$\pm$ 1	$\pm$ 4,1	$\pm$ 1	$\pm$ 4,4	$\pm$ 0,5	$\pm$ 0,9
		P[1]	$<$ 0,01	$<$ 0,01	$<$ 0,01	$<$ 0,05	$<$ 0,01	—	$<$ 0,01	$<$ 0,0
d) Lungenblähung mit 5 cm³ N_2 und Glucoseinjektion	6	M	156	126	110	104	106	53	45	38
		ε	$\pm$ 6	$\pm$ 6	$\pm$ 3,9	$\pm$ 0,8	$\pm$ 2,4	$\pm$ 3,8	$\pm$ 7,5	$\pm$ 2,8
e) Vagotomierte Tiere	17	M	130	100	84	94	105	57	43	40
	6[2]	ε	$\pm$ 1,8	$\pm$ 9,7	$\pm$ 9,6	$\pm$ 9,2	$\pm$ 6,6	$\pm$ 2,2	$\pm$ 5,6	$\pm$ 10
f) Vagotomierte Tiere, Blähung mit 5 cm³ Luft	6	M	130	99	99	96	95	54	39	44
		ε	$\pm$ 7,5	$\pm$ 5	$\pm$ 5,7	$\pm$ 2,1	$\pm$ 2,1	$\pm$ 4,4	$\pm$ 5,3	$\pm$ 3,8
g) Vagotomierte Tiere, elektr. Reizung d. zentr. Vagi	6	M	149					54		
		ε	$\pm$ 5,4					$\pm$ 8,3		
		P[3]	$<$ 0,01					—		
h) Glutaminsäure-injektion	6	M	151	110	107	105	101	72	58	58
		ε	$\pm$ 4,7	$\pm$ 2,5	$\pm$ 2,5	$\pm$ 3,5	$\pm$ 4,3	$\pm$ 2,2	$\pm$ 1,8	$\pm$ 2,3
		P[1]	$<$ 0,01	—	$<$ 0,05	$<$ 0,1	—	$<$ 0,01	$<$ 0,01	$<$ 0,0
i) Glutaminsäure- u. Glucoseinjektion	6	M	151	111	108	97	97	60	49	43
		ε	$\pm$ 5	$\pm$ 3,1	$\pm$ 3,9	$\pm$ 2,5	$\pm$ 2,9	$\pm$ 9	$\pm$ 3,5	$\pm$ 6

1.—5.: 5 Versuche an einem Tier im Abstand von je 15 min. Man beachte die Abnahme der Überlebenszeit von Erstickung zu Erstickung (Erholungsrückstand).

[1] In Vergleich gesetzt zu den Kontrolltieren der Versuchsserie a).

[2] Versuch 1 je 17, Versuche 2., 3., 4. und 5. je 6 Tiere.

[3] In Vergleich gesetzt zu den vagotomierten Tieren der Versuchsserie e).

schien dadurch wesentlich, die Überlebenszeit auf das doppelte vermehrt. Da Kontrollversuche an vagotomierten Tieren zu gleichen Ergebnissen führten, war der Effekt offenbar durch den O_2-Gehalt des Stickstoffs bedingt (vgl. Swann). Für diese Deutung spricht auch die Beobachtung, daß kurz nach Beendigung der Stickstoffbeatmung öfters 1—3 Atemzüge auftraten, welche denen am Ende der 1. Schnapp-Phase entsprachen. Auf diese folgte eine weitere, 40—60 sec dauernde apnoische Phase, dann erst die terminale Schnappatmung. Es hat den Anschein, daß die Tiere durch geringe O_2-Zufuhr von der präterminale Apnoe ins Stadium der 1. Schnapp-Phase zurückversetzt werden, so daß nach Beendigung der künstlichen Beatmung eine neue Erstickung abläuft.

Zur Ausschaltung mechanisch bedingter Kreislaufeffekte, sowie des veränderten Sauerstoffangebots sollte die Erregung der Dehnungsreceptoren bei kontinuierlicher Lungenblähung durch elektrische Reizung der zentralen Vagusstümpfe nachgeahmt werden.

Tabelle 1.

n sec		Präterminale Apnoe in sec					2. Schnapp-Phase in sec				
4.	5.	1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	3.	4.	5.
44 ± 3	43 ± 3	55 ± 1,1	47 ± 1,1	48 ± 2,5	45 ± 7,6	41 ± 4,9	19 ± 2,9	14 ± 0,8	8,5 ± 0,9	7,5 ± 0,8	10,5 ± 0,7
52 ± 8,1	50 ± 7,9	74 ± 8,9	58 ± 5,5	51 ± 5,8	50 ± 5,7	48 ± 6,7	31 ± 4,6	22 ± 5	21 ± 6	23 ± 5,9	23 ± 1,3
—	—	< 0,05	< 0,1	—	—	—	< 0,05	—	< 0,1	< 0,05	± 0,01
39 ± 4,6	44 ± 1,5	84 ± 2	66 ± 3,6	58 ± 1	60 ± 1	56 ± 1	17 ± 4,4	14 ± 0,8	11 ± 0,8	10 ± 1	10 ± 3
—	—	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,1	< 0,01	—	—	< 0,05	< 0,1	—
38 ± 4,2	38 ± 2,5	75 ± 2,9	61 ± 3,5	58 ± 2,5	51 ± 4,5	55 ± 2,9	27 ± 4	20 ± 3,2	14 ± 2,4	15 ± 2,6	12 ± 2,8
45 ± 3,4	55 ± 4,1	57 ± 0,8	35 ± 3,2	20 ± 4,8	21 ± 8,8	16 ± 2	16 ± 0,4	22 ± 6,3	24 ± 5,4	29 ± 9,4	34 ± 8,3
40 ± 1,5	38 ± 2,2	57 ± 4,3	37 ± 4,5	36 ± 6,4	33 ± 3,9	31 ± 4,9	19 ± 3,5	22 ± 4,8	19 ± 2,8	23 ± 4,5	25 ± 6,4
		68 ± 4,5 < 0,05					27 ± 4,4 < 0,05				
50 ± 4,3	47 ± 3,9	57 ± 1,6	37 ± 2,4	34 ± 2,4	41 ± 0,6	39 ± 3,3	22 ± 3,2	15 ± 2,7	14 ± 2,7 < 0,1	14 ± 4,7	14 ± 3,9
—	—	—					—	—		—	—
37 ± 4,5	36 ± 4,1	65 ± 3,7	49 ± 1,9	44 ± 1	47 ± 1,5	50 ± 4,5	26 ± 2	13 ± 2,5	16 ± 4	13 ± 3,5	11 ± 4,6

Die 1. Schnapp-Phase wurde nach dem Vorgehen von GÄNSHIRT u. Mitarb. vom Augenblick des Trachealverschlusses an gerechnet.

Weitere Einzelheiten s. Text.

Zunächst waren die zur Nachahmung der Blähungseffekte geeigneten Reizqualitäten zu ermitteln. Da der Reizerfolg nach den Arbeiten von WYSS (1939) an größeren Tieren vor allem von der Reizfrequenz abhängt, verwendeten wir zunächst bei informatorischen Versuchen ohne Erstickung die Reizdauer von 0,2 msec und variierten die Reizfrequenz bei Stromstärken von 1—4 mA zwischen 20 und 250/sec. 7 Versuche bei elektrischer Reizung des re. zentralen Vagusstumpfes ergaben für die Reizfrequenz von 100—250/sec Verminderungen der Atemfrequenz von der Norm (44/min) auf 24/min. Eine kurze Vagusapnoe trat dabei nur gelegentlich auf. Bei der Stromstärke von 1 mA und einer Reizfrequenz von 20/sec war die Atemfrequenz auf 53/min erhöht[1].

[1] „Starke inspiratorische Effekte", wie von WYSS u. RIVKINE (1950) für Kaninchen beschrieben, wo sie über Vagusfasern der B_1-Gruppe zustande kommen, sind nach orientierenden Versuchen bei der Ratte durch Vagusreizung nicht zu erzielen. Dies könnte vielleicht erklären, warum am Rattenzwerchfell bei Lungenkollaps nur geringfügige „tonische" Reaktionen beobachtet werden (TAUGNER, ESSIG u. DERTNIG).

Die Reizqualität von 0,2 msec, 4 mA und 250/sec führte an 6 doppelseitig vagotomierten Tieren — bei einseitiger Vagusreizung vom Beginn der Erstickung an — nur zu einer geringfügigen Verlängerung der Überlebenszeit. Auch die vergleichshalber an 6 Tieren erprobte Atemfrequenz-steigernde Reizqualität (0,2 msec, 1 mA, 20/sec) war ohne deutlichen Einfluß auf den Erstickungsablauf. Das gleiche gilt für die elektrische Reizung eines zentralen Ischiadicusstumpfes mit 4—6 mA, 0,2 msec und 250/sec[1].

Zur besseren Nachahmung der Atmungshemmung durch Lungenblähung wurde in weiteren Versuchen die Impulsdauer über größere Bereiche variiert. Als Kriterium vergleichbarer Effekte diente dabei nicht die erzielte Verminderung der Atemfrequenz, sondern die Dauer der Vagusapnoe. Bei empirischem Vorgehen erwies sich die elektrische Reizung eines Vagusstumpfes mit 50 msec, 10/sec und 0,5 mA als optimal. Die Vagusapnoe[2] dauerte dabei ohne Trachealabklemmung 10—20 sec. Zur Verstärkung des Effektes wurden beide zentralen Vagusstümpfe alternierend für 5 sec bzw. beide Vagi gleichzeitig für die gesamte Dauer der Erstickung gereizt.

Entsprechend Tab. 1 g wurde der Erstickungsablauf durch synchrone *doppelseitige Vagusreizung* deutlich modifiziert: Die Gesamtüberlebenszeit des Atmungszentrums war im Vergleich zu den vagotomierten Kontrollen erhöht. Dieser, mit den Ergebnissen bei Lungenblähung vergleichbare Effekt setzte sich aus Verlängerungen von präterminaler Apnoe und 2. Schnapp-Phase zusammen. Die Anzahl der Atemzüge in der 1. Schnapp-Phase war durch das Auftreten einer initialen „Vagus-Apnoe" (Dauer 25 ± 3,9 sec) von 29 auf 9 reduziert. Die gleichen Ergebnisse wurden mit alternierender Reizung beider Vagi für je 5 sec erzielt. Elektrische Reizung 30 sec nach Beginn der präterminalen Apnoe bzw. vom Beginn der 2. Schnapp-Phase an veränderte die Dauer dieser Stadien dagegen nicht wesentlich.

Durch diese Versuche schien die Beteiligung des *afferenten* Vagus an der Verlängerung der Überlebenszeit bei Lungenblähung gesichert. Zur Ausschaltung vasomotorischer Reaktionen bei elektrischer Reizung der zentralen Vagusstümpfe (vgl. Oberholzer) sollte in weiteren Versuchen eine plötzliche („totale") Ischämie des Gehirns durch Eröffnung des Thorax und gleichzeitige Durchtrennung von Aorta ascendens und A. Pulmonalis oder der Ventrikel erzeugt werden. Entsprechend Tab. 2 läuft dabei die Lähmung des Atmungszentrums wesentlich rascher ab als beim Abklemmen der Trachealkanüle. Elektrische Reizung eines zentralen Vagusstumpfes mit der bei Trachealverschluß nur schwach wirksamen Reizqualität von 0,2 msec, 4 mA und 250/sec führte hier — bei unveränderter Dauer — zur deutlichen Verminderung von Anzahl und Frequenz der Atemzüge während der 1. Schnapp-Phase[3]. Die prätermi-

[1] Vergl. H. Hermann, B. Bailly u. A. Missenard, C. r. Soc. Biol. (Paris) **137**, 547 (1943).

[2] Es handelt sich dabei um exspiratorische Reaktionen im Sinne von O. A. M. Wyss, die bei der geringen Reizfrequenz und langen Reizdauer möglicherweise durch repetierende Entladungen entstehen (vgl. de Molina u. O. A. M. Wyss).

[3] In dieser Versuchsreihe trat eine initiale Vagusapnoe von etwa 6 sec auf.

nale Apnoe war deutlich, die Gesamtüberlebenszeit von $59 \pm 2{,}6$ auf $86 \pm 5{,}7$ sec erhöht. Setzte die elektrische Reizung erst zu Beginn der präterminalen Apnoe ein, so ergaben sich von diesem Zeitpunkt an die gleichen Veränderungen (Tab. 2c).

Tabelle 2.

Versuchsserien	Anzahl der Tiere	Gesamtüberlebenszeit in sec	1. Schnapp-Phase: Dauer in sec	1. Schnapp-Phase: Anzahl d. Atemzüge	1. Schnapp-Phase: Atemfrequenz/min	Präterminale Apnoe in sec	2. Schnapp-Phase in sec
a) Kontrolltiere	8	$59 \pm 2{,}6$	$15 \pm 0{,}6$	$9 \pm 1{,}2$	$36 \pm 3{,}7$	32 ± 2	$12 \pm 0{,}9$
b) Reizung vom Beginn der Erstickung an	8	$86 \pm 5{,}7$ P: $< 0{,}01$	$15 \pm 0{,}8$	$6 \pm 0{,}5$ $< 0{,}05$	$24 \pm 2{,}6$ $< 0{,}05$	$50 \pm 4{,}6$ $< 0{,}01$	$19 \pm 5{,}7$
c) Reizung vom Beginn der präterm. Apnoe an	8	$85 \pm 7{,}9$ P: $< 0{,}01$	$13 \pm 1{,}1$	$9 \pm 0{,}8$	$41 \pm 4{,}7$	$54 \pm 6{,}6$ $< 0{,}01$	$18 \pm 2{,}7$ $< 0{,}05$
d) Reizung vom Beginn der 2. Schnapp-Phase an	8	$69 \pm 5{,}5$	$15 \pm 1{,}7$	$9 \pm 1{,}2$	$36 \pm 2{,}9$	$36 \pm 3{,}8$	17 ± 5

Elektrische Reizung eines zentralen Vagusstumpfes mit 0,2 msec, 4 mA und 250/sec. Es sind jeweils die Mittelwerte und deren mittlere Fehler angegeben. Tiergewichte hier ausnahmsweise 200—260 g. Nähere Erläuterung im Text.

Dauer und Atemfrequenz der 2. Schnapp-Phase wurden durch elektrische Vagusreizung vom Beginn dieses Stadiums an nicht deutlich modifiziert (Tab. 2d). In einer letzten Versuchsserie sollte daher geprüft

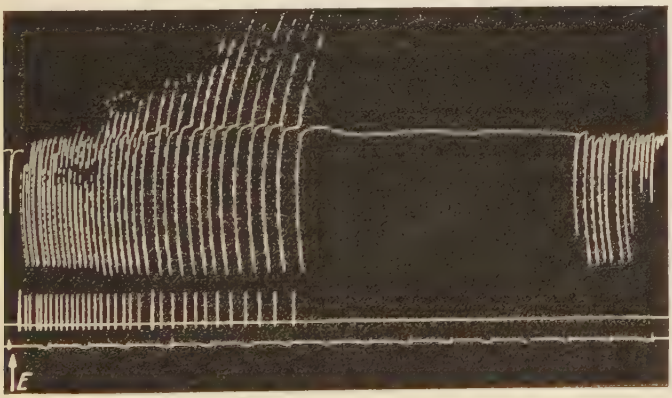


Abb. 1. Erstickung einer vagotomierten Ratte durch Trachealverschluß (*E*), aufgezeichnet mit MAREYscher Kapsel. Inspiration abwärts. Mitte: Schnappartige Bewegungen des Unterkiefers, von Hand registriert. Unten: Zeit in 10 sec.

werden, ob vielleicht andere Charakteristika der 2. Schnapp-Phase über den Vagus beeinflußbar sind. Die Atemexkursionen wurden dabei mit einer im Nebenschluß befindlichen MAREYschen Kapsel registriert. Zur

Anwendung kam die stärkste atmungshemmende Reizqualität von 1 mA, 50 msec und 10/sec. Abb. 1 gibt den typischen Verlauf der unbeeinflußten Erstickung nach doppelseitiger Vagotomie wieder. Beachtenswert scheint, daß — in Übereinstimmung mit Versuchen am isolierten Bauchmuskelstreifen — aktive Exspirationsbewegungen nur während der 1. Schnapp-Phase auftreten. Sie fehlen, wie auch die schnappartigen Unterkieferbewegungen, während der 2. Schnapp-Phase[1] (vgl. Tschirgi und Gerard). Aus Abb. 2 geht hervor, daß die doppelseitige elektrische Reizung der zentralen Vagusstümpfe bis zum Schluß der 1. Schnapp-Phase zu einer Vagus-Apnoe führt. Auch die 2. Schnapp-Phase scheint durch die elektrische Reizung kurzdauernd unterbrochen.

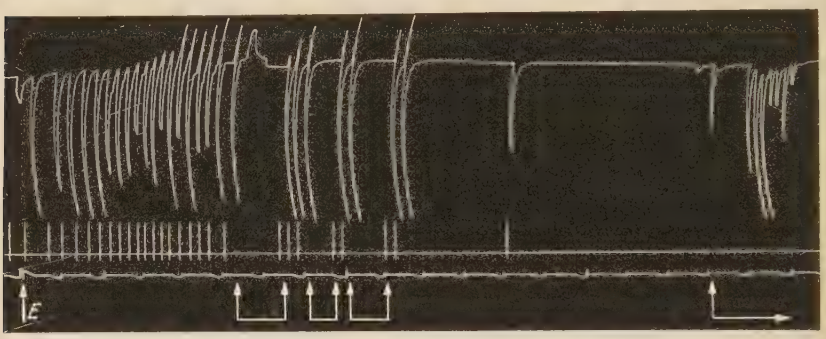


Abb. 2. Erstickung einer vagotomierten Ratte durch Trachealverschluß (*E*). Registrierungen wie in Abb. 1. Die Pfeile zeigen während der 1. Schnapp-Phase Beginn und Ende, während der 2. Schnapp-Phase den Beginn der doppelseitigen, synchronen elektrischen Vagusreizung an. Nähere Erläuterung im Text.

Zur Sicherung dieses schwachen Reizeffektes wurden — nach 8 Kontrollversuchen — 14 derartige Versuche mit elektrischer Reizung vom 2. Atemzug der 2. Schnapp-Phase an durchgeführt. In den Kontrollversuchen stieg mit 1 Ausnahme die Atemfrequenz bis zum Ende der Atemtätigkeit an. Die elektrische Reizung führte in 9 von 14 Versuchen zur kurzdauernden Verlangsamung der Schnappatmung: Das Intervall zwischen dem 2. und 3. Atemzug betrug bei den Kontrollen $2{,}66 \pm 0{,}07$ sec, bei den 14 Tieren mit elektrischer Reizung dagegen $4{,}25 \pm 0{,}89$ sec. Dieser Unterschied kann mit einer Wahrscheinlichkeit von 99% ($P < 0{,}01$) als statistisch gesichert betrachtet werden. Auch die Größe des 3. Atemzuges der 2. Schnapp-Phase war in der Mehrzahl der Fälle, entgegen dem typischen Verlauf ohne elektrische Reizung, deutlich vermindert.

Damit schien im Prinzip erwiesen, daß die Atmung während der 2. Schnapp-Phase, wenn auch deutlich geringer als zu Beginn der Erstickung, noch über den Vagus beeinflußt werden kann.

[1] Die Angabe von Gray, daß bei Trachealabklemmung in der 2. Schnapp-Phase ausschließlich exspiratorische Atemexkursionen vorkommen, dürfte auf einem Irrtum beruhen. Er registrierte die Atembewegungen mit einem Hebel der an der Haut um den proc. xiphoides befestigt war. Auch bei Verwendung des isolierten Bauchmuskelstreifens fanden wir in diesem Stadium niemals aktive Exspirationsbewegungen.

Glutaminsäure führte in einer Dosierung von 12 mg/100 g entsprechend Tab. 1 h im 1., 2. und 3. Versuch zur Verlängerung der 1. Schnapp-Phase und dadurch der Gesamtüberlebenszeit. Dieser Befund stimmt mit der Auffassung überein, daß die 1. Schnapp-Phase von aeroben Stoffwechselvorgängen abhängt. Glutathion (1 g/kg i. p.) war allerdings in den Versuchen von Hiestand und Nelson ohne Effekt. Die Injektion von 50 mg *Glucose* zusammen mit 12 mg Glutaminsäure/100 g führte nicht zur weiteren Verlängerung der Überlebenszeit (Tab. 1 i). 1 min nach i.v. Injektion von 2 mg *ATP*/100 g war die Überlebenszeit zwar von 124 auf $143 + 5{,}5$ sec erhöht ($P < 0{,}01$). Da ADP, MAP und Pyrophosphat aber ähnliche Effekte auslösten, handelt es sich wohl um unspezifische Effekte von Phosphationen.

Diskussion der Versuchsergebnisse.

Verschiedene Umstände deuten darauf hin, daß die Verlängerung der Überlebenszeit des asphyktischen Atmungszentrums bei Lungenblähung durch die inspirationshemmenden, langsam adaptierenden Dehnungsreceptoren der Lunge (vgl. Adrian) vermittelt wird:

1. Die Verlängerung der Überlebenszeit kommt nur bei intakten Vagi zustande und ist im wesentlichen vom vermehrten Sauerstoffangebot bei Lungenblähung unabhängig.

2. Ähnliche Verlängerungen der Überlebenszeit können auch nach Vagotomie durch elektrische Reizung der zentralen Vagusstümpfe erzielt werden. Voraussetzung dafür scheint, daß der atmungshemmende, im Sinne von O. A. M. Wyss (1943) exspiratorische Effekt der Lungenblähung, gemessen an der „Vagusapnoe", durch die elektrische Reizung weitgehend nachgeahmt wird.

3. Veränderungen der Gehirndurchblutung als Folge afferenter Vagusreizung sind nach den Versuchen mit plötzlicher Unterbrechung der Blutzirkulation an dem Effekt nicht beteiligt.

Die Zunahme der Gesamtüberlebenszeit des Atmungszentrums, welche sich — bei Stickstoffblähung und Vagusreizung vom Beginn der Erstickung an — aus Verlängerungen von präterminaler Apnoe und 2. Schnapp-Phase zusammensetzt, könnte einmal durch direkte reflektorische Einflüsse auf diese späteren Stadien der terminalen Atmung selbst zustande kommen. Eine zweite Erklärung wäre, daß die Verlängerung der nachfolgenden Stadien indirekt, über die 1. Schnapp-Phase erfolgt. Die Dauer der 1. Schnapp-Phase — vom Augenblick der Lungenblähung bzw. Trachealabklemmung an gerechnet — war zwar nur ausnahmsweise, vor allem bei Luftblähung, verlängert, bei Stickstoffblähung unter Umständen sogar verkürzt; es könnte jedoch sein, daß es durch die initiale Vagusapnoe zu einer geringeren Ausschöpfung respiratorischer Energien und dadurch zur Verlängerung der späteren Stadien kommt. Diese Deutung würde u. a. erklären, wieso atmungshemmende Reizqualitäten die Überlebenszeit verlängern können. Für derartige indirekte Beeinflussungen des späteren Erstickungsablaufs scheint auch die Beobachtung zu sprechen, daß die Überlebenszeit bei Trachealabklemmung nur durch elektrische Reizung vom Beginn der 1. Schnapp-Phase an deutlich verlängert wurde. In den

Versuchen mit plötzlicher Unterbrechung der Blutzirkulation und wesentlich rascher ablaufender Atmungslähmung führte dagegen auch die elektrische Reizung vom Beginn der präterminalen Apnoe an zur Beeinflussung des weiteren Erstickungsablaufs. Die Aufzeichnung der Atemexkursionen mit Mareyscher Kapsel deckte dementsprechend auch bei Erstickung durch Trachealverschluß während der 2. Schnapp-Phase kurzdauernde, atmungshemmende Reizeffekte auf. Die Einflüsse der vagalen Afferenzen nehmen hier allerdings mit dem Fortschreiten der Erstickung wesentlich ab. Alle diese Überlegungen führen zu dem Schluß, daß die späteren Stadien der Atmungslähmung (präterminale Apnoe und 2. Schnapp-Phase) durch vagale Afferenzen sowohl direkt als auch indirekt über die 1. Schnapp-Phase modifiziert werden können. Da auch Pharmaka die terminale Atmung u. U. beeinflussen (vgl. die Versuche von Waltz u. Taugner mit Coramin), erscheint es fraglich, ob die „Schnappatmung" tatsächlich den unveränderlichen ursprünglichen Atemtypus darstellt (vgl. K. Bucher).

Die vorliegenden Ergebnisse scheinen außerdem gewisse Vermutungen über das Zustandekommen der eigenartigen Dreiteilung der terminalen Atmung zu rechtfertigen. Gewöhnlich wird angenommen, daß die 2. Schnapp-Phase ausschließlich auf die Tätigkeit eines primitiven medullären „gasping center" zurückzuführen ist (Lumsden), welches nach der anoxischen Lähmung phylogenetisch jüngerer Zentren mit einer gewissen Latenz (präterminale Apnoe) in Funktion tritt (vgl. Tschirgi und Gerard). Die — wenn auch geringe — reflektorische Beeinflußbarkeit der 2. Schnapp-Phase spricht nicht für diese Auffassung. Opitz und Lorenzen beobachteten, daß auch der Cornealreflex bei totaler Ischämie des Gehirns in 2 Stadien ablaufen kann, welche etwa den beiden Schnappatmungs-Phasen entsprechen. Man könnte die präterminale Apnoe ebenso wie das vorübergehende Verschwinden des Cornealreflexes daher wohl auch als Ausdruck einer allgemeineren, vielleicht durch anoxische Erregung bestimmter Zentren entstehenden, zentralen Hemmung ansehen. Gegen diese Auffassung sprechen allerdings informatorische Versuche mit Myanesin: Dieses beeinflußt nämlich in Dosen, welche die multisynaptischen Rückenmarksreflexe lähmen, den gewöhnlichen Ablauf der Erstickung nicht.

Glucose verlängert die 2. (anaerobe), Glutaminsäure dagegen die 1. (aerobe) Schnapp-Phase (Gänshirt u. Mitarb., vorliegende Untersuchungen). In der Hoffnung, den Effekt der Lungenblähung durch einen dieser Stoffe verstärken und dadurch bestimmten Abschnitten der terminalen Atmung zuordnen zu können, wurde die i.v. Injektion von Glucose bzw. Glutaminsäure mit Lungenblähung kombiniert. Eine wesentliche Modifikation der Blähungseffekte war dadurch jedoch nicht zu erreichen.

Zusammenfassung.

Es wird eine Verlängerung der Überlebenszeit des asphyktischen Atmungszentrums durch Lungenblähung beschrieben. Da ähnliche Effekte nach Vagotomie nicht auftreten, durch elektrische Reizung der zentralen Vagusstümpfe dagegen zu erzielen sind, scheint es sich dabei um reflektorische Einflüsse von seiten der Dehnungsreceptoren in der Lunge zu handeln. Glucose und Glutaminsäure, die an sich zu einer Verlängerung der Überlebenszeit führen, verstärkten die Wirkung der Lungenblähung nicht.

Literatur.

Adrian, E. D.: Afferent impulses in the vagus and their effect on respiration. J. of Physiol. **79**, 332 (1933). — Binet, L., et M. V. Strumza: CO_2 total plasmatique artériel et déclanchement de la reprise respiratoire après apnée primaire anoxique.

C. r. Soc. Biol. (Paris) **145**, 192 (1951). Vgl. auch **144**, 784 (1950). — Bucher, K.: Reflektorische Beeinflußbarkeit der Lungenatmung. Wien: Springer 1952. — Eichholtz, F., u. R. Taugner: Der isolierte Zwerchfellstreifen mit natürlicher Innervation. Eine neue Methode zur Untersuchung der Reaktionen des Atmungszentrums. Pflügers Arch. **254**, 267 (1951). — Fernandez de Molina, A., and O. A. M. Wyss: Fibres respiratoires du nerf vague. Helvet. physiol. Acta **8**, 87 (1950). Vgl. auch S. 464. — Gänshirt, H., G. Severin u. W. Zylka: Der Einfluß von Sauerstoff, Kohlensäure und Glucose auf die Schnappatmung der Ratte. Pflügers Arch. **255**, 283 (1952). — Gray, St. W.: Respiratory movements of rat during drowning and influence of water temperature upon survival after submersion. Amer. J. Physiol. **167**, 95 (1951). — Hiestand, W. A., and J. W. Nelson: Survival of the isolated respiratory center in the young rat as influenced by adrenaline, ephedrine, insulin and glutathione and the relation to glycemia changes. Amer. J. Physiol. **146**, 241 (1946). — Lumsden, Th.: Observations on the respiratory centres in the cat. J. of Physiol. **57**, 153 (1923). — De Molina, F., u. O. A. M. Wyss: Selektive Reizung des afferenten Lungenvagus. Helvet. physiol. Acta **8**, 464 (1950). — Oberholzer, R. J. H.: Über die Beziehungen zwischen Blutdruck- und Atmungseffekten bei afferenter Vagusreizung. Helvet. physiol. Acta **3**, 445 (1945). — Opitz, E., u. U. K. Lorenzen: Vergleich der Wirkungsgeschwindigkeit von reiner Anoxie und totaler Ischämie auf das Kaninchengehirn. Pflügers Arch. **253**, 412 (1951). — Taugner, R., M. Essig u. R. Dertnig: Über die „tonische" Wirkung des Vagus bei der Selbststeuerung der Atmung. Pflügers Arch. **256**, 277 (1953). — Tschirgi, R. D., and R. W. Gerard: The carotidmandibular reflex in acute respiratory failure. Amer. J. Physiol. **150**, 358 (1947). — Waltz, H., u. R. Taugner: Über die Wirkung der Analeptica bei Atmungslähmung durch Erstickung und Entblutung. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **217**, 264 (1953). — Wyss, O. A. M.: Reizphysiologische Analyse des afferenten Lungenvagus. Pflügers Arch. **242**, 215 (1939). — Helvet. physiol. Acta **1**, 301 (1943). — Wyss, O. A. M., u. A. Rivkine: Les fibres afférentes du nerf vague participant aux reflexes respiratoires. Helvet. physiol. Acta **8**, 87 (1950).

Dr. H.-G. Straub, Heidelberg, Pharmakol. Institut der Universität.

Aufnahmebedingungen.

I. Sachliche Anforderungen.

1. Der Inhalt der Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören.
2. Der Inhalt der Arbeit darf nicht — sei es auch nur zum Teil oder in anderer sprachlicher Fassung — bereits bei einer anderen Zeitschrift zur Veröffentlichung gelangt oder eingereicht sein.
3. Die Arbeit muß wissenschaftlich wertvoll sein und Neues bringen. Bloße Bestätigungen bereits anerkannter Befunde können, wenn überhaupt, nur in kürzester Form aufgenommen werden. Dasselbe gilt von Versuchen und Beobachtungen, die ein positives Resultat nicht ergeben haben. Arbeiten rein referierenden Inhalts werden abgelehnt, vorläufige Mitteilungen nur ausnahmsweise aufgenommen. Polemiken sind zu vermeiden, kurze Richtigstellung der Tatsachen ist zulässig. Aufsätze spekulativen Inhalts sind nur dann geeignet, wenn sie durch neue Gesichtspunkte die Forschung anregen.

II. Formelle Anforderungen.

1. Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben sein. Die Abbildungsvorlagen sind auf besonderen Blättern zu liefern. Diktierte Arbeiten bedürfen der stilistischen Durcharbeitung zwecks Vermeidung von weitschweifiger und umständlicher Darstellung. Absätze sind nur zulässig, wenn sie neue Gedankengänge bezeichnen.
2. Die Arbeiten müssen *kurz* und sprachlich gut geschrieben sein. Ausführliche historische Einleitungen sind zu vermeiden. Die Fragestellung kann durch wenige Sätze klargelegt werden. Der Anschluß an frühere Behandlungen des Themas ist durch Hinweis auf die letzten Literaturzusammenstellungen (in Monographien, „Ergebnissen", Handbüchern) herzustellen.
3. Der Weg, auf dem die Resultate gewonnen wurden, muß klar erkennbar sein; jedoch hat eine ausführliche Darlegung der Methodik nur dann Wert, wenn sie wesentlich Neues enthält.
4. Jeder Arbeit ist eine kurze Zusammenstellung (höchstens 1 Seite) der wesentlichen Ergebnisse anzufügen, hinter welche besondere Inhaltsverzeichnisse für einzelne Arbeiten nicht abgedruckt werden.
5. Von jeder Versuchsart bzw. jedem Tatsachenbestand ist in der Regel nur *ein* Protokoll (Krankengeschichten, Sonderbericht, Versuch) im Telegrammstil als Beispiel in knappster Form mitzuteilen. Das übrige Beweismaterial ist im Text oder, wenn dies nicht zu umgehen ist, in Tabellenform gebracht werden; dabei müssen aber umfangreiche tabellarische Zusammenstellungen unbedingt vermieden werden. (Es wird empfohlen, durch eine Fußnote darauf hinzuweisen, in welchem Institut das gesamte Beweismaterial eingesehen oder angefordert werden kann.)
6. Die *Abbildungen* sind auf das wirklich *unbedingt Notwendige* zu beschränken. Kurven, Diagramme usw., die nur zur Illustration von Befunden dienen, die ohne weiteres im Text beschrieben werden können, werden zurückgewiesen. Anders gilt dies von Rußkurven, die nur angebracht werden, wenn damit ganz außergewöhnliche, neue Befunde bewiesen werden. Kurze, aber erschöpfende Abbildungsunterschriften erübrigen nochmalige Beschreibung im Text. Für jede Tatsachart, jede Krankenbeschreibung, jedes Präparat ist nur ein gleichartiges Bild, Kurve u. ä. zulässig. Unzulässig ist die doppelte Darstellung in Tabelle und Kurve. Didaktische Gesichtspunkte bleiben bei der Entscheidung über die Annahme einer Abbildung außer Betracht, da das Archiv nicht von Anfängern gelesen wird.
   a) Für Halbtonbilder (Photos, Rußkurven) sind reproduktionsfähige, d. h. scharfe, gut durchgezeichnete Vorlagen (Hochglanzabzüge!) einzureichen.
   b) Für Kurven und Schwarzweißzeichnungen, die als Strichätzung reproduziert werden sollen, sind saubere, klare, tiefschwarzer Tusche auf weißes Zeichen- oder Transparentpapier gezeichnete Vorlagen abzuliefern, die nicht mehr gezeichnet zu werden brauchen. Ist eine Beschriftung vorgesehen, so ist sie ebenfalls reproduktionsfähig in klarer, deutlicher Blockschrift einzutragen. Ist der Autor dazu nicht in der Lage, wird um Angabe des Beschriftungstextes in Maschinenschrift gebeten. Bei der Beschriftung durch den Autor ist zu beachten, daß die Höhe der Großbuchstaben und Zahlen in der reproduzierten Abbildung 2 mm betragen soll. Ist also eine lineare Verkleinerung der Strichzeichnung auf ½ vorgesehen, so müßten die Buchstaben 4 mm groß gezeichnet werden.
7. Literaturangaben, die nur im Text berücksichtigte Arbeiten enthalten dürfen, erfolgen mit vollständigem Titel der Arbeit, Zeitschriftentitel in der Abkürzung nach den Periodica medica, Band-, Seiten- und Jahreszahl (Wochenschriften nur Jahres- und Seitenzahl). Die Literaturangaben sind am Schluß der Arbeit nach den Autorennamen alphabetisch anzuordnen und nicht zu numerieren. Werden mehrere Arbeiten des gleichen Autors zitiert, so ist an der betreffenden Stelle im Text eine in Klammer gesetzte 1, 2 bzw. 3 hinter dem Autorennamen einzufügen. Im Literaturverzeichnis steht diese Zahl, ebenfalls in Klammern gesetzt, vor der betreffenden Arbeit. Bücher müssen mit vollem Titel, Auflage, Ort, Verlag und Jahr zitiert werden.
8. Die Beschreibung von Methodik, Protokollen und anderen weniger wichtigen Teilen ist für *Kleindruck* vorzusehen. Die Lesbarkeit des Wesentlichen wird hierdurch gehoben.
9. Das Zerlegen einer Arbeit in mehrere Mitteilungen, um den Anschein größerer Kürze zu erwecken, ist unzulässig.
10. Bei Anführungen von Handelspräparaten soll stets neben der Markenbezeichnung die chemische Zusammensetzung angegeben werden.
11. Doppeltitel sind aus bibliographischen Gründen unerwünscht. Das gilt insbesondere, wenn die Autoren in Ober- und Untertitel nicht die gleichen sind.
12. Festschriften, Habilitationsschriften und Monographien gehören nicht in den Rahmen einer Zeitschrift.

Soeben erschien:

Einführung in die Physiologie des Menschen

Von Professor Dr. **Hermann Rein †. Elfte,** umgearbeitete Auflage, herausgegeben von Dr. **M. Schneider,** o. Professor der Physiologie, Direktor des Instituts für normale und pathologische Physiologie der Universität Köln. Mit 481 Abbildungen. XII, 685 Seiten Gr.-8°. 1955. Ganzleinen DM 48.—

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Soeben erschien:

Hormone und ihre Wirkungsweise.

5. Colloquium der Gesellschaft für Physiologische Chemie am 30. April/1. Mai 1954 in Mosbach (Baden). Mit 52 Textabbildungen. VI, 238 Seiten 8°. 1955.

Steif geheftet DM 25.80

Inhaltsübersicht: **Vergleichende Physiologie der Hormonwirkungen.** Von G. Koller, Saarbrücken. — **Die Physiologie der Hypophysenvorderlappenhormone** (mit Anschluß des adrenocorticotropen Hormons). Von E. Voss, Mannheim-Waldhof. — **Propriétés physiologiques et mécanisme de régulation de la sécrétion corticotrope (ACTH).** Par H. Tuchmann-Duplessis, Paris. — **Le mode d'action de l'insuline.** Par Ch. de Duve, Louvain. — **Die Wirkungsweise des Schilddrüsenhormones.** Von C. Martius, Würzburg. — **Über die Wirkungsweise der Steroidhormone.** Von W. Dirscherl, Bonn. — **Biosynthese der Steroidhormone.** Von H. Staudinger, Mannheim. — **Der Stoffwechsel von Nebennierenrinden-Hormonen und verwandten Steroiden.** Von H. J. Hübener, Frankfurt a M.

Das jährliche, unter diesem Namen bereits weitbekannte „Mosbacher Colloquium" betraf 1954 die Hormone und deren Wirkungsmechanismus, ein Thema also, das nach wie vor eine zentrale Stellung nicht nur in der Biochemie und Physiologie, sondern auch in der Klinik einnimmt, und das in den letzten Jahren, u. a. auf Grund fortschreitender Erkenntnisse z. B. über die Proteohormone ganz neue Aspekte gewonnen hat. Die vorliegenden acht Vorträge vermitteln zusammen mit den eingehenden Diskussionen eine lebendige Vorstellung von dem augenblicklichen Stand und den neuen Entwicklungen, die sich in der Forschung anbahnen.

Früher erschienen:

Biologie und Wirkung der Fermente

4. Colloquium der Gesellschaft für Physiologische Chemie am 17./18. April 1953 in Mosbach (Baden)

Mit 32 Textabbildungen und 1 Tafel. V, 176 Seiten 8°. 1953. Steif geheftet DM 19.60

Die Chemie und der Stoffwechsel des Nervengewebes

3. Colloquium der Gesellchaft für Physiologische Chemie am 26./27. April 1952 in Mosbach (Baden)

Mit 23 Textabbildungen. IV, 153 Seiten 8°. 1952. Steif geheftet DM 15.60

Mikroskopische und chemische Organisation der Zelle

2. Colloquium der Gesellschaft für Physiologische Chemie am 6./7. April 1951 in Mosbach (Baden)

Mit 25 Textabbildungen. IV, 102 Seiten 8°. 1952. Steif geheftet DM 9.60

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Diesem Heft liegen zwei Prospekte des Springer-Verlages, Berlin · Göttingen · Heidelberg, bei.

Verantwortlich für den Anzeigenteil: Günter Holtz, Berlin W 35, Reichpietschufer 20. — Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg. — Druck: Wiesbadener Graphische Betriebe GmbH — Printed in Germany.